

**Proteomanalyse des anaeroben regulatorischen Netzwerkes  
von *Pseudomonas aeruginosa***

Von dem Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Nicole Quäck

aus Rodewisch / Vogtland

1. Referent: Prof. Dr. D. Jahn

2. Referent: Prof. Dr. K. N. Timmis

eingereicht am: 14.04.2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 29.06.2005

Druckjahr: 2005

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. D. Jahn, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Trunk, K., Quäck, N., Münch, R., Eschbach, M., Jänsch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., Jahn, D. und Schobert, M. Two redox regulators – one DNA binding site: definition of the *Pseudomonas aeruginosa* Anr and Dnr regulons. (eingereicht zur Publikation).

Erzähle mir und ich vergesse.

Zeige mir und ich erinnere.

Lass es mich tun und ich verstehe.

*(Konfuzius)*



## Inhaltsverzeichnis

|  |               |
|--|---------------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b>      |
| <b>1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>                             | <b>1</b>      |
| <b>1.2 Mukoviszidose</b>   | <b>2</b>      |
| <b>1.3 Biofilmbildung</b>  | <b>5</b>      |
| <b>1.4 Energiestoffwechsel von <i>P. aeruginosa</i></b>              | <b>7</b>      |
| <b>1.5 Denitrifikation</b>   | <b>9</b>      |
| 1.5.1 Regulatoren und Regulation der Denitrifikation                 | 12            |
| 1.5.1.1 Die Fnr-Homologe Anr und Dnr                                 | 13            |
| 1.5.1.2 Das Nitratsensorsystem NarXL                                 | 14            |
| 1.5.1.3 Der DNA-biegende „integration host factor“ (IHF)             | 15            |
| 1.5.1.4 Das regulatorische Netzwerk der Denitrifikation              | 15            |
| <b>1.6 Proteomanalyse</b>  | <b>17</b>     |
| <b>1.7 Zielsetzung der Arbeit</b>                                    | <b>20</b>     |
| <br><b>2. Material und Methoden</b>                                  | <br><b>21</b> |
| <b>2.1 Bakterienstämme</b>   | <b>21</b>     |
| <b>2.2 Vektoren</b>  | <b>22</b>     |
| <b>2.3 Kulturmedien und Zellzüchtung</b>                             | <b>23</b>     |
| 2.3.1 Komplexmedium  | 23            |
| 2.3.2 Minimalmedien  | 24            |
| 2.3.3 Medienzusätze  | 24            |
| 2.3.4 Bestimmung der Zelldichte                                      | 25            |
| 2.3.5 Wachstumsbedingungen   | 25            |
| <b>2.4 Lagerung von Bakterienkulturen</b>                            | <b>25</b>     |
| <b>2.5 DNA-Isolierung</b>  | <b>26</b>     |
| 2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>P. aeruginosa</i>            | 26            |
| 2.5.2 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> und <i>P. aeruginosa</i> | 26            |
| <b>2.6 Fällung von DNA</b>   | <b>27</b>     |
| <b>2.7 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA</b>           | <b>27</b>     |
| <b>2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten</b>                          | <b>27</b>     |
| <b>2.9 Enzymatische Modifizierungen von DNA</b>                      | <b>28</b>     |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 2.9.1       | Restriktion von DNA .....  | 28        |
| 2.9.2       | Dephosphorylierung .....   | 28        |
| 2.9.3       | Ligation.....  | 28        |
| <b>2.10</b> | <b>Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>2.11</b> | <b>Transformation von Bakterien mittels Elektroporation .....</b>  | <b>29</b> |
| 2.11.1      | <i>Escherichia coli</i> .....  | 29        |
| 2.11.2      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | 29        |
| 2.11.3      | Zweipunkt Kreuzung („diparental mating“) zur Transformation von <i>P. aeruginosa</i> .....   | 30        |
| 2.11.4      | Isolierung eines Cosmides aus einer <i>P. aeruginosa</i> -Genbank.....   | 30        |
| <b>2.12</b> | <b>Southern Blot .....</b>   | <b>32</b> |
| 2.12.1      | Sondenherstellung.....   | 32        |
| 2.12.2      | DNA-DNA-Hybridisierung .....   | 33        |
| <b>2.13</b> | <b>Klonierungsstrategien .....</b>   | <b>34</b> |
| 2.13.1      | Konstruktion von <i>gfp</i> -Reportergenfusionen des <i>nap</i> - und <i>nar</i> -Promotors.....   | 34        |
| 2.13.2      | Bestimmung der Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP).....   | 36        |
| 2.13.3      | Konstruktion von <i>P. aeruginosa</i> Knockout-Mutanten .....  | 37        |
| 2.13.3.1    | Konstruktion der chromosomalen <i>nap</i> -Deletionsmutante PANQ02 .....   | 39        |
| 2.13.3.2    | Konstruktion der chromosomalen <i>nar</i> -Deletionsmutante PANQ05 .....   | 40        |
| 2.13.3.3    | Konstruktion der chromosomalen <i>nap-nar</i> -Doppelmutante PANQ06 ....   | 41        |
| <b>2.14</b> | <b>Proteom-Analyse: Zwei-dimensionale Gelelektrophorese mit immobilisierten pH Gradienten (IPG) und massenspektroskopischer Proteinidentifizierung .....</b> | <b>41</b> |
| 2.14.1      | Zellernte .....  | 41        |
| 2.14.2      | Phenolextraktion und Acetatfällung der Proteine .....  | 41        |
| 2.14.3      | Bestimmung der Proteinkonzentration.....   | 42        |
| 2.14.3.1    | BCA-Test.....  | 42        |
| 2.14.3.2    | Proteinbestimmung mit dem Plus One 2D Quant Kit.....   | 43        |
| 2.14.3.3    | Bradford-Test.....   | 43        |
| 2.14.3.4    | Absorptionsmessung .....   | 43        |
| 2.14.4      | Rehydratisierung der Proteine .....  | 43        |
| 2.14.5      | Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten (IPG).....  | 44        |
| 2.14.6      | SDS-PAGE als zweite Dimension der 2D-Elektrophorese .....  | 46        |
| 2.14.7      | Fixierung und Färbung der Gele.....  | 48        |
| 2.14.7.1    | Färbung mit kolloidalem Coomassie .....  | 48        |

## Inhaltsverzeichnis

---

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 2.14.7.2    | Silberfärbung .....  | 48        |
| 2.14.7.3    | Fluoreszenzfärbung .....   | 49        |
| 2.14.8      | Dokumentation und Auswertung der Gele .....  | 50        |
| 2.14.9      | Identifizierung von Proteinen .....  | 51        |
| 2.14.9.1    | Tryptischer Verdau und Peptidextraktion .....  | 51        |
| 2.14.9.2    | Aufreinigung der Peptide .....   | 52        |
| <b>2.15</b> | <b>Biofilmuntersuchungen.....</b>  | <b>52</b> |
| 2.15.1      | Das Durchflußzellen-System („Flow chamber“) .....  | 53        |
| 2.15.2      | Visualisierung der Zellen im Biofilm .....   | 55        |
| 2.15.2.1    | Färbung mit SYTO 62 .....  | 55        |
| 2.15.2.2    | Markierung der Zellen durch GFP mittels eines mini-Tn7<br>Transposon-Systems.....                                      | 56        |
| 2.15.3      | Mikrotiterplatten-Test auf Biofilmbildung .....  | 56        |
| <b>3.</b>   | <b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Proteomanalysen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>  | <b>58</b> |
| 3.1.1       | Etablierung der 2D-Gelelektrophorese .....   | 58        |
| 3.1.2       | Zelluläre Proteinextrakte und deren Quantifizierung.....   | 58        |
| 3.1.2.1     | Auswahl geeigneter pH-Gradienten und<br>Polyacrylamidkonzentrationen .....   | 60        |
| 3.1.2.2     | Wahl der geeigneten Proteinfärbemethode .....  | 62        |
| 3.1.2.3     | Datenverarbeitung und Reproduzierbarkeit .....   | 63        |
| 3.1.3       | Analyse des Proteoms von <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) unter denitrifizierenden<br>Bedingungen im Vollnährmedium LB..... | 68        |
| 3.1.3.1     | Gruppe 1: Anaerob induzierte Proteine bei Wachstum in<br>Vollmedium mit Nitrat.....                                    | 71        |
| 3.1.3.2     | Gruppe 2: Aerob induzierte Proteine bei Wachstum auf<br>Vollmedium mit Nitrat.....                                     | 85        |
| 3.1.3.3     | Gruppe 3: Proteine, deren Bildung durch den Sauerstoffpartialdruck<br>nicht reguliert wird.....                        | 87        |
| 3.1.3.4     | Vergleich experimentell ermittelter pI- und Molekulargewichte (Mw)<br>mit theoretisch errechneten Werten .....         | 88        |
| 3.1.4       | Analyse des Proteoms von <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) unter denitrifizierenden<br>Bedingungen im Minimalmedium AB ..... | 93        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 3.1.4.1    | Gruppe 1: Anaerob induzierte Proteine bei Wachstum auf Minimalmedium mit Nitrat .....  | 96         |
| 3.1.4.2    | Gruppe 2 : Aerob induzierte Proteine bei Wachstum auf Minimalmedium mit Nitrat .....   | 102        |
| 3.1.4.3    | Gruppe 3 : Stark gebildete und in ihrer Konzentration unveränderte Proteine bei Wachstum auf Minimalmedium mit Nitrat .....  | 104        |
| 3.1.4.4    | Vergleich der Proteinmuster von <i>P. aeruginosa</i> –Zellen aus LB-Medium mit Minimalmedium AB .....  | 108        |
| 3.1.4.5    | Statistische Auswertungen der Verteilung von unterschiedlich gebildeten Proteinen im 2D-Gel .....  | 110        |
| 3.1.5      | Zeitliche Dynamik des Proteinmusters.....  | 112        |
| 3.1.6      | Analyse des Proteoms von PAO9104, einer <i>narL</i> -Mutante von <i>P. aeruginosa</i> , unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB .....                            | 117        |
| 3.1.7      | Analyse des Proteoms von RM536, einer <i>dnr</i> -Mutante von <i>P. aeruginosa</i> , unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB .....                               | 123        |
| 3.1.8      | Analyse des Proteoms von PAO6261, einer <i>anr</i> -Mutante von <i>P. aeruginosa</i> unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB .....                               | 131        |
| 3.1.9      | Analyse des Proteoms der PAO6261 <i>anr</i> -Mutante, welche mit dem <i>dnr</i> -Gen (pHA541) komplementiert wurde, unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB..... | 138        |
| 3.1.9.1    | Proteine mit potentieller Anr-Bindestelle im Promotorbereich der entsprechenden Gene .....   | 143        |
| 3.1.9.2    | Proteine ohne potentielle Anr-Bindestelle im Promotorbereich der entsprechenden Gene .....   | 150        |
| <b>3.2</b> | <b>Charakterisierung der dissimilatorischen Nitratreduktasen in <i>P. aeruginosa</i> .....</b>   | <b>153</b> |
| 3.2.1      | Ausschalten der chromosomalen Nitratreduktasegene <i>napABCDE</i> und <i>narGHJ</i> in <i>P. aeruginosa</i> .....  | 154        |
| 3.2.2      | Bedeutung der Nitratreduktasen NapABC und NarGHI für die Denitrifikation.....  | 156        |
| 3.2.3      | Komplementation der Mutanten PANQ05 ( $\Delta narGHJ$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDE$ , $\Delta narGHJ$ ) mit einem Cosmid, welches die Gene des <i>nar</i> -Operons enthält..... | 158        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 3.2.4     | Wachstum der chromosomalen <i>P. aeruginosa</i> Mutante PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) während des Übergangs von aeroben zu denitrifizierenden Bedingungen ..... | 160        |
| 3.2.5     | Einfluss der dissimilatorischen Nitratreduktasen von <i>P. aeruginosa</i> auf die Biofilmbildung .....  | 163        |
| 3.2.5.1   | Das "Flow chamber" System für die Analyse von Biofilmen .....   | 164        |
| 3.2.5.2   | Test der hergestellten <i>gfp</i> -Fusionen des <i>napE</i> - und <i>narK</i> - Promotors unter aeroben und anaeroben Bedingungen in einer Schüttelkultur....   | 168        |
| 3.2.5.3   | Promotoraktivitäten der Gene für die Nitratreduktasen NarGHIJ und NapABC während der Biofilmbildung .....   | 171        |
| 3.2.5.4   | Mikrotiterplatten-Assay .....   | 174        |
| <b>4.</b> | <b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>  | <b>178</b> |
| 4.1       | Zusammenfassungen .....   | 178        |
| 4.2       | Ausblicke .....   | 179        |
| <b>5.</b> | <b>Literatur und Internet - Adressen .....</b>  | <b>180</b> |
| 5.1       | Literatur .....   | 180        |
| 5.2       | Internet - Adressen .....   | 198        |

## Abkürzungen

|           |   |
|-----------|---|
| AB        | Minimalmedium AB  |
| Abb.      | Abbildung   |
| ABG       | Minimalmedium AB mit Glukose  |
| AP        | Alkalische Phosphatase  |
| Ap        | Ampicillin  |
| APS       | Ammoniumperoxodisulfat  |
| ATP       | Adenosin-5'-triphosphat   |
| BCA       | Bicinchonininsäure („bicinchoninic acid“)   |
| Bezeichg. | Bezeichnung   |
| Bfr       | Bacterioferritin  |
| BLAST     | “Basic Local Alignment Search Tool”   |
| bp        | Basenpaare („base pairs“)   |
| BSA       | Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)  |
| bzw.      | beziehungsweise   |
| ca.       | zirka   |
| CDP       | Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro (1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo (3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ) decan)-4-yl)-1-phenylphosphat |
| CF        | Zystische Fibrose („Cystic Fibrosis“)   |
| CFTR      | “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”   |
| CHAPS     | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat  |
| Cm        | Chloramphenicol   |
| CoA       | Coenzym A   |
| Da        | Dalton  |
| DE        | unterschiedliche Expression (“different expression”)  |
| d.h.      | das heißt   |
| DIG       | Digoxygenin   |
| DMF       | N, N-Dimethylformamid   |
| DMSO      | Dimethylsulfoxid  |
| DNA       | Desoxyribonukleinsäure (“desoxyribonucleic acid”)   |
| dpi       | Punkte pro Zoll (“dots per inch”)   |
| ds        | Doppelstrang (“double strain”)  |
| DTT       | Dithiotreitol   |
| dNTP      | 2'-Desoxynukleosid (A-, C-, G-, T-)-5'-triphosphat  |
| dUTP      | 2'-Desoxynukleosid (U-)-5'-triphosphat  |

## Abkürzungen

---

|                          |   |
|--------------------------|---|
| $E_{\lambda}$            | Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda$ nm                               |
| EDTA                     | Ethylendiamintetraessigsäure („ethylenediaminetetra-acetic acid“)         |
| EPS                      | Exopolysaccharid  |
| GAPDH                    | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                                  |
| GFP                      | grün fluoreszierendes Protein („green fluorescence proteins“)             |
| Gm                       | Gentamycin  |
| IEF                      | Isoelektrische Fokussierung   |
| IEP                      | Isoelektrischer Punkt   |
| IPG                      | immobilisierter pH-Gradient   |
| Kap.                     | Kapitel   |
| kb                       | Kilobasenpaare (1 kb = 1000 bp)   |
| LB                       | Luria-Bertani   |
| LOG                      | Logarithmus   |
| M                        | Molarität   |
| MALDI                    | “Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation”                             |
| MCS                      | Multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“)                      |
| MGD                      | Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid  |
| MilliQ                   | reinst. H <sub>2</sub> O, Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0.05 $\mu$ S |
| Mw                       | molekulare Masse („molecular weight“)                                     |
| mRNA                     | Boten-RNA („messenger RNA“)   |
| MS                       | Massenspektroskopie   |
| NADH                     | Nicotinamid-adenosin-dinukleotid (reduzierte Form)                        |
| Nr.                      | Nummer  |
| $OD_{\lambda}$           | Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda$ nm                          |
| PAGE                     | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| PCR                      | Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)                   |
| PEG                      | Polyethylenglykole  |
| prakt.                   | Praktisch   |
| QS                       | Quorum sensing  |
| RE                       | relative Expression („relative expression“)                               |
| reinst. H <sub>2</sub> O | Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0.05 $\mu$ S                           |
| RMG                      | „raw master gel“  |
| RNA                      | Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)                                     |
| rpm                      | Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)                              |
| RT                       | Raumtemperatur  |
| RuBPS                    | Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat                                |

## Abkürzungen

---

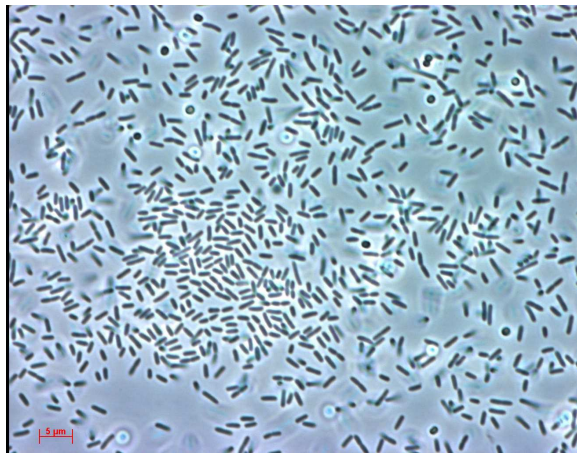
|            |  |
|------------|--|
| s.         | siehe  |
| SAP        | Alkalische Phosphatase aus Garnele ("shrimp alkaline phosphatase") |
| SDS        | Natriumdodecylsulfat („sodium dodecylsulfate“)                     |
| SOD        | Superoxid-Dismutase  |
| SP         | Signalpeptid   |
| Tab.       | Tabelle  |
| TAE        | Tris-Acetat-EDTA   |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i>   |
| TEMED      | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin  |
| theor.     | theoretisch  |
| TM         | Eingetragenes Warenzeichen ( <i>trade mark</i> )                   |
| TOF        | „Time Of Flight“   |
| Tris       | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                   |
| USP        | universelles Stress-Protein ("universal stress protein")           |
| UV         | Ultraviolett   |
| (v/v)      | Volumen pro Volumen ("volume per volume")                          |
| (w/v)      | Gewicht pro Volumen („weight per volume“)                          |
| XGal       | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galaktopyranosid              |
| z.B.       | zum Beispiel   |
| 2-D        | zweidimensional  |



## 1. Einleitung

### 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Bei *Pseudomonas aeruginosa* handelt es sich um ein Gram negatives, polytrich polar begeißeltes Stäbchenbakterium. Taxonomisch zählt die Gattung *Pseudomonas* zur Familie der *Pseudomonadaceae*, welche in die Gruppe der Proteobakterien eingeordnet wird (Schlegel, 1992; Madigan, 2003; Palleroni, 2004).



**Abb.1: Lichtmikroskopische Aufnahme von *P. aeruginosa* im Vollnährmedium LB**

Dieses Bakterium ist ein ubiquitär vorkommender Organismus und gilt als weit verbreiteter Boden- und Feuchtheim. Gegenüber dem Vorkommen von Nährstoffen zeigt sich *P. aeruginosa* äußerst anspruchslos und kann daher aus der Umwelt fast überall dort isoliert werden, wo ein feuchtes Milieu herrscht und zumindest Spuren organischer Substanzen vorkommen (Palleroni, 2004). Darüber hinaus ist *P. aeruginosa* ein opportunistisches Humanpathogen (Schlegel, 1992; Kayser, 1998; Madigan, 2003; Palleroni, 2004).

Entdeckt wurde *P. aeruginosa* als pathogener Keim im Jahre 1882 und wurde zunächst nur in Verbindung mit dem von ihm verursachten blau-grünen Eiter gebracht. Heute jedoch ist bekannt, dass *P. aeruginosa* an einer Vielzahl unterschiedlicher Infektionen beteiligt sein kann (Pollack, 2000).

Allerdings sind die Abwehrmechanismen gesunder Menschen in der Regel in der Lage, den Erreger abzuwehren. Zu schweren Infektionen kommt es nur bei bestimmten prädisponierten Patientengruppen. Bedeutende Prädispositionen für eine Infektion sind einerseits eine Schwächung der Immunabwehr und andererseits offene Wunden der Haut

oder Schleimhäute, z. B bei Verbrennungen (Kayser, 1998; Madigan, 2003; Palleroni, 2004).

Eine wichtige Rolle spielt das Bakterium weiterhin bei Patienten mit Mukoviszidose (zystischer Fibrose), bei denen es im Verlaufe der Krankheit in den allermeisten Fällen zu einer chronischen Infektion des Respirationstraktes durch *P. aeruginosa* kommt (Dockter, 1997; Salyers und Whitt, 2002; Madigan, 2003)

*P. aeruginosa* ist aufgrund seines Bedrohungspotentials für immunsupprimierte Menschen vor allem in Krankenhäusern sehr gefürchtet, denn ein beträchtlicher Anteil aller nosokomialen Infektionen geht auf dieses Bakterium zurück (Kayser, 1998). Ein besonderes Problem und eine der Ursachen dieser zahlreichen Infektionen in Krankenhäusern ist die natürlich vorhandene hohe Resistenz gegenüber einer größeren Anzahl gebräuchlicher Antibiotika (Salyers und Whitt, 2002). Zudem bildet *P. aeruginosa* eine Schleimschicht aus Polysacchariden (Alginate) und Proteinen, die neben der natürlichen Resistenz gegen eine Vielzahl von Antibiotika einen zusätzlichen Schutz bietet und einen weiteren Virulenzfaktor darstellt (Pier *et al.*, 1990; Hentzer *et al.*, 2001).

Die genannten Faktoren machen *P. aeruginosa* zu einem bedeutenden opportunistischen Pathogen für Pflanzen, Tiere und den Menschen.

### 1.2 Mukoviszidose

Bei der Mukoviszidose, auch als zystische Fibrose (CF, Cystic Fibrosis) bezeichnet, handelt es sich um eine monogene erbliche Erkrankung. Im Jahre 1989 wurde erkannt, dass die Ursache der Erkrankung eine Mutation des CFTR-Gens („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) auf dem menschlichen Chromosom 7 ist (Riordan *et al.*, 1989). Durch eine Mutation dieses Gens kommt es in den Epithelien zu einer Störung des transepithelialen Transportes von Chloridionen. Diese Störung bewirkt eine deutlich erhöhte NaCl-Konzentration sowie erhöhte Viskosität aller Körpersekrete der betroffenen Patienten. Die nicht abfließenden Sekrete rufen häufig Entzündungsreaktionen in Organen wie beispielsweise dem Pankreas oder der Galle hervor.

Eine noch größere Gefahr aber geht für die CF-Patienten von dem durch die gestörte Sekretion veränderten Milieu im Respirationstrakt aus. Auf den Epithelzellen der Lungen eines gesunden Menschen liegt eine dünne und leicht viskose Schleimschicht. Die Flimmerhärchen transportieren den Schleim mitsamt der darin enthaltenen Fremdkörper nach außen und reinigen damit die Oberfläche der Epithelzellen (Abb.2a). Durch den genetischen Defekt des zellulären Transportproteins CFTR kommt es in der Lunge zu einer erhöhten Reabsorption von Wasser in die Epithelzellen der Luftwege. Dadurch wird

die Zone der Pericilliarflüssigkeit, die sich zwischen den Epithelzellen und der aufgelagerten Schleimhaut befindet äußerst gering, so dass der Schleim auf den Cilien zum liegen kommt (Abb.2b). Diese Cilien können daher ihre physiologische Aufgabe, eingedrungene Fremdkörper mit der Schleimschicht aus der Lunge heraus zu transportieren, nicht mehr nachkommen. Die anhaltende Sekretion von Schleim, der nicht abtransportiert wird, resultiert in einer immer dicker werdenden Schleimschicht, auch Mukus genannt (Abb.2c). Die verdickte Schleimschicht schränkt die Ciliarbewegung zusätzlich durch ihr Gewicht und ihre Konsistenz stark ein. Neben dieser erhöhten Wasserabsorption kommt es durch die Mutation auch zu einer stärkeren Reabsorption von Natrium- und Chlorid-Ionen in die Epithelzellen, was sich in einer erhöhten Natrium/Kalium-ATPaseaktivität auswirkt. Aus dieser resultiert ein erhöhter Sauerstoffbedarf der Zelle, so dass sich in der verdickten Schleimschicht langsam ein anoxxygenes Milieu einstellt (in Abb. 2a-f durch rot-blaue Balken dargestellt)(Worlitzsch *et al.*, 2002).

Im Mukus kommt es dann verstärkt zu bakteriellen Infektionen, welche zu chronischen Lungenentzündungen führen. Diese chronischen Infektionen führen zu Gewebsschädigungen der pulmonalen Epithelien und verminderter Lungenfunktion. Das Lungenversagen ist heute bei CF-Patienten die häufigste Todesursache.

Im zeitlichen Verlauf der chronischen Infektion wird die CF-Lunge häufig von *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, später gefolgt von *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und *Aspergillus spec.* besiedelt. Das weitaus größte Problem in der Therapie der chronisch infizierten CF-Lunge stellt heute der opportunistisch pathogene Erreger *P. aeruginosa* dar. Der Hauptgrund hierfür ist die bereits erwähnte hohe natürliche Antibiotika-Resistenz dieses Keimes.

Durch Inhalation aufgenommen, gelangt *P. aeruginosa* durch aktive Flagellenbewegung, aber auch durch passive Schleimumschichtungen, in das Innere des Mukus (Abb.2d). Nach der Besiedlung der Lunge erfolgt dann in der Regel eine umfangreiche Adaption des Erregers an das dortige Habitat. Während die Bakterien zu Beginn der Infektion den typischen Phänotyp eines Umweltisolates zeigen unterliegen sie im Folgenden einer Umwandlung in den sogenannten mucoiden Phänotyp. Der Ausgangsphänotyp ist hierbei von hoher Beweglichkeit und verfügt über vollständige Lipopolysaccharidstrukturen. Der angepasste mucoide Phänotyp hingegen zeigt nur noch eine stark eingeschränkte Bewegungsfähigkeit, produziert kein vollständiges Lipopolysaccharid mehr und sekretiert in der Regel nur noch reduzierte Mengen an Proteasen, Exotoxinen und Siderophoren. Die augenscheinlichste Veränderung aber ist die immens erhöhte Produktion des Exopolysaccharides Alginate. Mit diesem Alginate umgeben sich die Bakterien mit einer

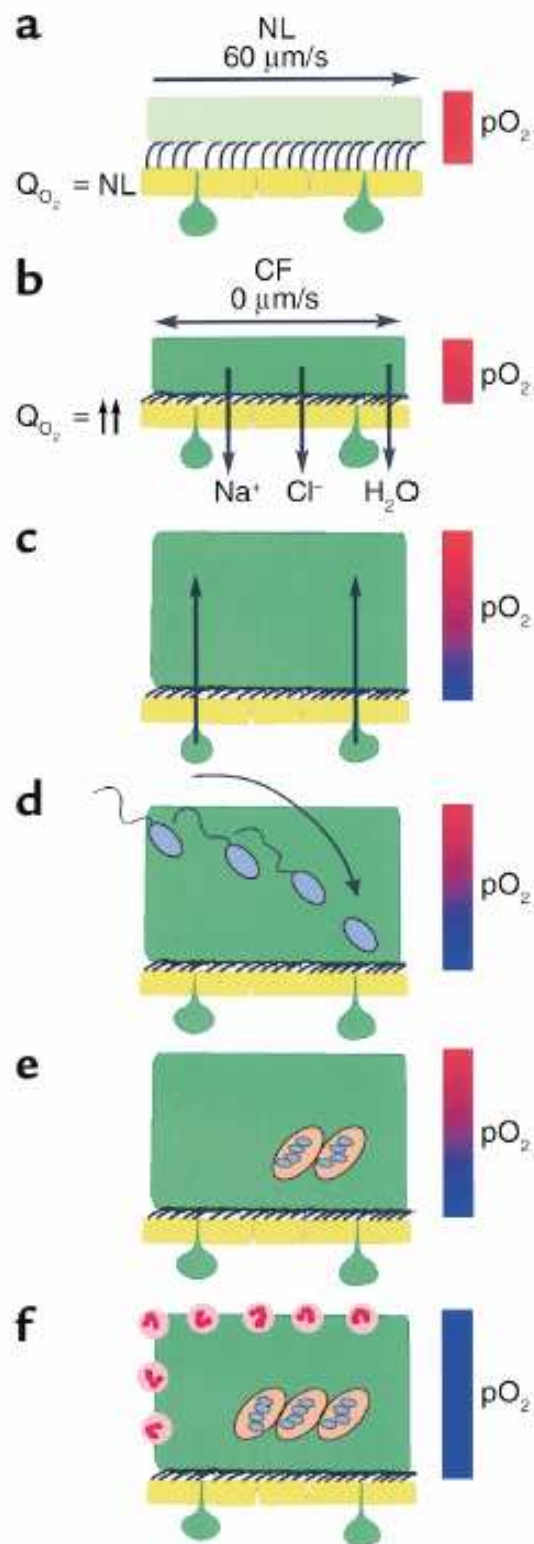


Abb.2a-f: Schematisches Modell der pathologischen Ereignisse, welche zu einer chronischen *P. aeruginosa*-Infektion in den Lungen bei Patienten mit Zystischer Fibrose führen (aus Worlitzsch et al., 2002). Details siehe Seite 3 ff.

schleimigen Hülle. Diese Schleimhülle und die dicke Mukusschicht, in welcher *P. aeruginosa* in der Lunge in biofilmartigen Mikrokolonien wächst (Abb.2e+f), schützt ihn wirkungsvoll vor dem Abwehrsystem des Patienten und erschwert eine effektive Antibiotikatherapie, beispielsweise mit Tobramycin, durch die daraus resultierende Diffusionsbarriere (Hentzer *et al.*, 2001).

Durch die persistente Infektion von *P. aeruginosa* kommt es in der Lunge zu chronischen Entzündungen und daraus hervorgehend zu starken Gewebsschädigungen, die schließlich die Lungenfunktion massiv reduzieren.

Mit dem routinemäßigen Einsatz von Antibiotika ist es heute möglich die chronische Lungeninfektion der CF-Patienten über einen längeren Zeitraum in Grenzen zu halten. Mit dieser Behandlung kann der Krankheitsverlauf günstig beeinflusst und die Lungenfunktion über Jahre relativ stabil gehalten werden. Von einer Heilung der Krankheit oder einer Verhinderung bakterieller Infektionen kann aber heute noch nicht die Rede sein.

### 1.3 Biofilmbildung

Laut Madigan (2003) versteht man unter einem Biofilm „Kolonien von schleimumhüllten, mikrobiellen Zellen, die an einer Oberfläche haften“, wobei die Oberfläche eine Grenzschicht zu fest/gasförmig, fest/flüssig oder flüssig/gasförmig sein kann. Bei der Entstehung von Biofilmen unterscheidet man fünf verschiedene Phasen (Sauer *et al.*, 2002):

Bei der initialen Adhäsion (Phase I; „reversible attachment“) treten planktonische Zellen über schwache Bindungskräfte (elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, London-Kräfte) mit der Phasengrenze in Kontakt. Der Erfolg dieser Anheftung ist unter anderem davon abhängig, ob die Zellen Flagellen besitzen, da diese nach Forschungsergebnissen von O'Toole and Kolter (1998) an der Adhäsion beteiligt sind. Die initiale Anheftung ist reversibel. Von *P. aeruginosa* ist bekannt, dass sich die Zellen mittels ihrer Typ IV-Pili auf der Oberfläche bewegen können („twitching motility“; O'Toole and Kolter, 1998) um sich mit anderen Zellen zusammenzulagern.

In der Phase II („irreversible attachment“) haften Zellen irreversibel an der Oberfläche an und bilden so genannte Mikrokolonien. Diese wachsen aufeinander zu und beginnen mit der Produktion von extrazellulären, polymeren Substanzen. Ab hier sind deutliche Unterschiede in der zellulären Genexpression und damit im Proteom der Biofilmzellen im Vergleich zu planktonischen Zellen zu erkennen (Sauer, 2002).

Durch das Wachstum der Mikrokolonien nähern sich diese gegenseitig an (Phase III; „maturing I“) und wachsen schließlich übereinander (Phase IV; Maturing II). Im Laufe der Zeit entsteht somit eine mehrschichtige, komplexe, dreidimensionale Struktur, die durch Bereiche mit hoher Zelldichte, eingebettet in eine dichte Polymermatrix und Kanäle mit geringer Polymerkonzentration charakterisiert wird (Costerton *et al.*, 1994). Die Nährstoffversorgung der Zellen funktioniert hauptsächlich durch diffusiven Stofftransport entlang der Zellschichten, aber auch die gebildeten Kanäle leisten durch konvektiven Stofftransport einen Beitrag zur Nährstoffversorgung der tiefer gelegenen Zellen. Da der Hauptmechanismus aber auf dem Prinzip der Diffusion beruht, bilden sich innerhalb des Biofilms deutliche Stoffgradienten aus, so dass sich innerhalb der Polymermatrix Zellgruppen in den verschiedenen Mikroumgebungen unterschiedlich entwickeln. Ein Biofilm ist somit äußerst heterogen aufgebaut.

An die Maturing II-Phase schließt sich die „dispersion“-Phase (Phase V) an. Diese ist dadurch charakterisiert, dass sich Biofilmzellen im Gleichgewicht zur Neubildung von Zellen aus dem Verband lösen. Dies geschieht entweder durch Erosion der Biofilmoberflächenzellen, durch Herausreißen ganzer Fetzen („sloughing“) oder durch aktive Bewegung der Bakterien, die aus dem Zellverband heraus schwimmen und Löcher hinterlassen (Sauer, 2002). Die herausgelösten Zellen können an anderer Stelle einen neuen Biofilm bilden.

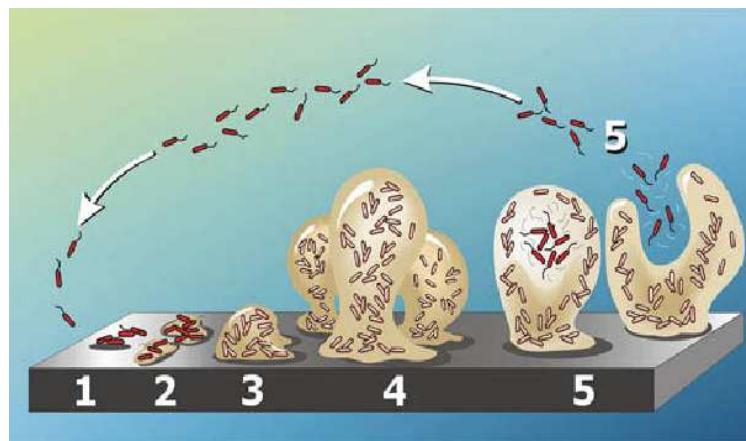
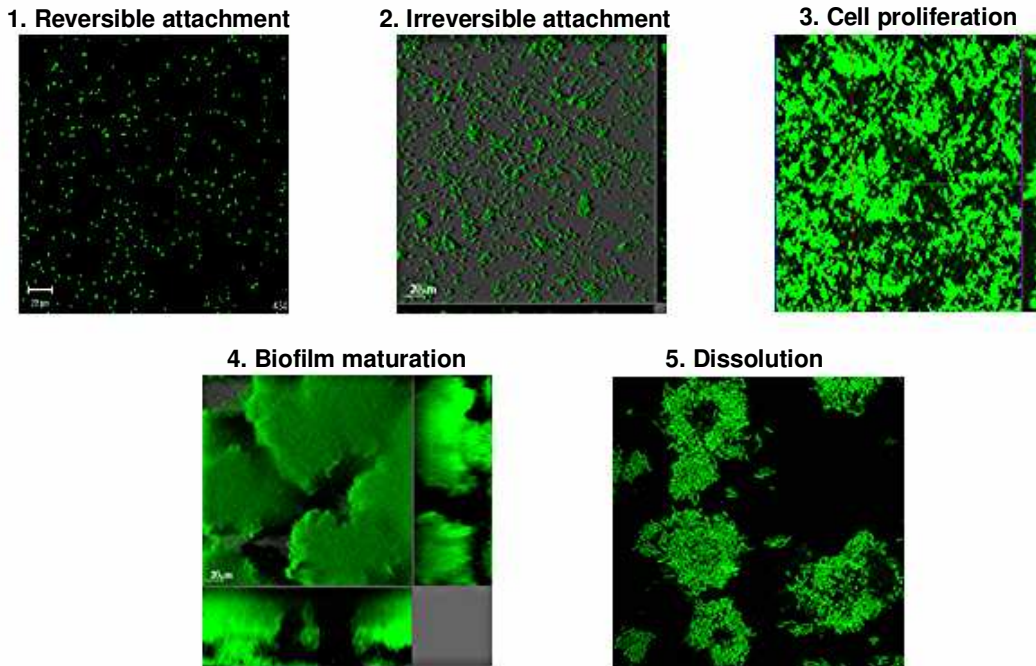


Abb. 3: Die fünf Phasen der Biofilmbildung (Stoodley, *et al.*, 2002)

Im konvokalen Laserscanning-Mikroskop können die fünf Stadien wie folgt beobachtet werden:



**Abb. 4: Die fünf Phasen der Biofilmbildung von *P. aeruginosa*, beobachtet im konvokalen Laserscanning-Mikroskop (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Morten Hentzer, Technische Universität Dänemark, Lyngby)**

Das Wachstum in einem Biofilm ist für Mikroorganismen (insbesondere Bakterien) aus mehreren Gründen wichtig:

- Der Biofilm bietet durch seine EPS-Matrix einen hervorragenden Schutz gegen Umwelteinflüsse wie Biozide und Austrocknung (Watnick and Kolter, 2000; Stoodley *et al.*, 2002).
- In den Mikronischen des Biofilms mit sehr konstanten Lebensbedingungen können angepasste Bakterien effektiv überleben.
- Der enge Kontakt zwischen den Individuen ermöglicht einen Austausch genetischen Materials durch den Bakterien Selektionsvorteile, wie z.B. Antibiotikaresistenzen erlangen können (Watnick and Kolter, 2000).

### 1.4 Energiestoffwechsel von *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* besitzt einen sehr effizienten aeroben Stoffwechsel und kann mit einer Generationszeit von nur etwa 20 min bei 37 °C in Vollmedium wachsen. *P. aeruginosa* kann sich im Gegensatz zu anderen Pseudomonaden aber auch bei 42 °C vermehren. Es ist in der Lage, eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen zu nutzen. Dazu gehören

verschiedene Dicarbonsäuren, Tricarbonsäuren, Zucker, Fettsäuren, Alkohole, Polyalkohole, Glycole, aromatische Verbindungen, Amine und Aminosäuren. Für den Abbau von Glucose verwenden Pseudomonaden den Entner-Doudoroff-Weg, wohingegen Enterobakterien den Embden-Meyerhoff-Weg bevorzugen. Allerdings nutzt *P. aeruginosa* anstelle von Glucose bevorzugt organische Säuren, vor allem Zwischenprodukte des Citratzyklus. Es wurde beschrieben, dass das Bakterium aerobe Wachstumsbedingungen vorzieht (Palleroni, 2004), es gibt jedoch Hinweise, dass es ein mikroaerobes Milieu für optimales Wachstum bevorzugt (Sabra *et al.*, 2002).

Unter anaeroben Bedingungen führt *P. aeruginosa* eine Denitrifikation durch, wenn Nitrat oder Nitrit als alternative Elektronenakzeptoren anstelle von Sauerstoff vorhanden sind (Davies *et al.*, 1989, Zumft, 1997). Wenn kein Nitrat oder Nitrit zur Verfügung steht, kann die Umsetzung von Arginin anaerob für Überleben und Wachstum dienen (Vander Wauven *et al.*, 1984).

Durch die Folgen der Mutation in dem CFTR-Gen bei CF-Patienten und dem Verbrauch von Sauerstoff durch Bakterien (Infektion) entwickelt sich in der verdickten Schleimschicht langsam ein anoxxygenes Milieu. Tatsächlich ergaben Untersuchungen an CF-Patienten, dass im Vergleich zum Lungenlumen im Mukus der Sauerstoffpartialdruck um 95,5% reduziert ist (Worlitzsch *et al.*, 2002). Die sich im Mukus ansiedelnden Bakterien müssen daher ihren Metabolismus von aerober auf anaerobe Weise umstellen.

Des Weiteren konnten Messungen zeigen, dass im Sputum und im Mukus von CF-Patienten sowohl Nitrat (ca. 30 - 420  $\mu\text{M}$ ) als auch Nitrit (ca. 100  $\mu\text{M}$ ) vorhanden sind (Hassett, 1996 a, Grasemann *et al.*, 1998, Worlitzsch *et al.*, 2002).

Unter diesen Bedingungen kann *P. aeruginosa* Nitrat und Nitrit als alternative Elektronenendakzeptoren für die Denitrifikation nutzen.

Zudem konnten im Sputum von CF-Patienten hohe Konzentrationen der *P. aeruginosa* spezifischen acetylierten Homoserin-Lactone (AHL), *N*-3-oxo-dodecanoyl-Homoserin-Lacton (OdDHL,  $\text{C}_{12}$ -HSL) und *N*-Butyryl-Homoserin-Lacton (BHL,  $\text{C}_4$ -HSL) nachgewiesen werden (Singh *et al.*, 2000). Beide Moleküle sind involviert in Quorum Sensing Prozesse von *P. aeruginosa* (Passador *et al.*, 1993, Pearson *et al.*, 1995).

Quorum Sensing (QS) ist eine bakterielle Kommunikationsform, die die Expression von Genen in Abhängigkeit von der Zelldichte reguliert. Pathogene Eigenschaften von *P. aeruginosa*, wie die Produktion von Virulenzfaktoren (Passador *et al.*, 1993),



Antibiotikaresistenzen (de Kievit und Iglewski, 2000) und Biofilmentwicklung (Davies *et al.*, 1998) sind von diesem Mechanismus abhängig.

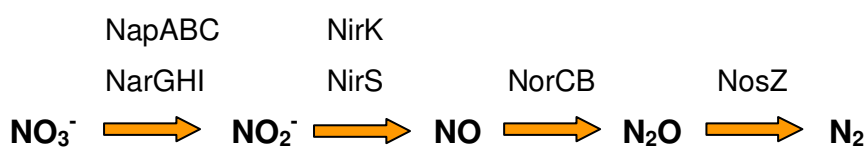
Es wurden bereits mit Hilfe von DNA-Microarray-Analysen mehr als 600 Quorum Sensing regulierte Gene in *P. aeruginosa* beschrieben (Wagner *et al.*, 2003). Zweidrittel dieser Gene werden durch Quorum Sensing aktiviert, ein Drittel der Gene wird reprimiert.

Eines der QS-regulierten Gene, identifiziert von Whiteley *et al.* (1999), ist *qsc135* (quorum sensing control). Dieses Gen ist 100% identisch zu dem *snr-1*-Gen (shared nitrate reduction) in *P. aeruginosa* (Hassett *et al.*, 2002) und das Protein Snr-1 (PA3032) ist essentiell für anaerobes Wachstum mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor (Kerschen *et al.*, 2001). Es wurde weiterhin beschrieben, dass Quorum Sensing die Expression von *snr-1* kontrolliert, welches dann Einfluss auf die Rate der Denitrifikation nimmt, indem die Wachstumsrate von *P. aeruginosa* verlangsamt wird (Hassett *et al.*, 2002).

Diese vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, dass *P. aeruginosa*-Zellen im Mukus von CF-Patienten biofilmartige Zellverbände (Mikrokolonien) bilden und unter vorherrschenden anaeroben Bedingungen Nitrat und Nitrit während der Denitrifikation als terminalen Elektronenakzeptoren zur Energiegewinnung nutzen.

### 1.5 Denitrifikation

Die N-Oxide werden bei der Denitrifikation anstelle von Sauerstoff in mehreren Schritten unter Bildung von molekularem Stickstoff reduziert (Abb.3).

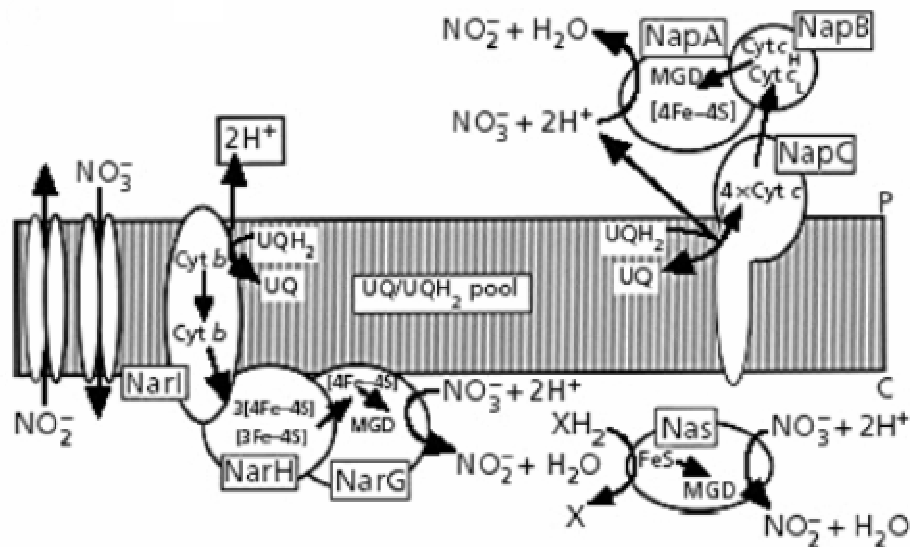


**Abb. 5: Die Reaktionen der Denitrifikation und die für die einzelnen Schritte zur Verfügung stehenden Enzyme.**

NapABC, periplasmatische Nitratreduktase; NarGHI, cytoplasmatische Nitratreduktase; NirK, respiratorische Nitritreduktase (kupferhaltig); NirS, respiratorische Nitritreduktase; NorCB, NO-Reduktase; NosZ,  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase.

Nitrit ist das erste Produkt, das bei Prokaryonten im Rahmen der Denitrifikation durch die Reaktion von dissimilatorischen Nitratreduktasen entstehen kann. Bisher sind zwei Enzymtypen bekannt, eine periplasmatische (NapABC) und eine membranständige,

cytoplasmatisch orientierte Nitratreduktase (NarGHI) (Moreno-Vivian *et al.*, 1999, Potter *et al.*, 2001).



**Abb.6: Übersicht über die Nitratreduktasen bei *Paracoccus*-Species.** NarGHI, die membrangebundene Nitratreduktase; NapABC, die periplasmatische Nitratreduktase und Nas, die assimilatorische Nitratreduktase. P, Periplasma; C, Cytoplasma (Richardson, 2000).

Die im Periplasma lokalisierte dissimilatorische Nitratreduktase NapABC besteht aus einem Heterodimer NapAB, wobei NapA ein Fe-S-Zentrum und ein Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) Kofaktor besitzt, an welchem die Reduktion von Nitrat zu Nitrit stattfindet. Die Elektronen transportierende Untereinheit NapB enthält zwei Häm c Moleküle, über die von einem membranverankerten Protein (NapC) Elektronen aus dem Chinonspeicher bezogen werden (Potter *et al.*, 2001; Moreno-Vivian *et al.*, 1999).

Für dieses Enzym werden in unterschiedlichen Prokaryonten verschiedene Funktionen postuliert. Eine Hauptaufgabe scheint darin zu bestehen, als nicht protonenpumpende terminale Oxidase das Redoxgleichgewicht zu wahren (Richardson, 2000). Das Aufrechterhalten einer zweckmäßigen Redoxbalance kann unter einigen physiologischen Bedingungen für ein optimales Wachstum nötig sein, vor allem während Fermentationsprozessen, oxidativen Metabolismus von hochreduzierten Kohlenstoffquellen oder anaerobes phototrophes Wachstum (Moreno-Vivian *et al.*, 1999, Richardson, 2000).

Da Sauerstoff die primäre Denitrifikation auf der Ebene des Nitrattransportes inhibiert und das Nap-System diesen Transport nicht benötigt, führen einige Denitrifizierer zusätzlich eine aerobe Denitrifikation aus (Bell *et al.*, 1990). Da der Elektronentransport aber auch in Abwesenheit von Sauerstoff erhalten bleibt, erleichtert dies das Leben unter

mikroaerophilen Bedingungen und fördert deutlich den Übergang zu anaerobem Stoffwechsel (Moreno-Vivian et al, 1999).

Im Gegensatz zur cytoplasmatischen Nitratreduktase NarGHI leistet die periplasmatische Nitratreduktase keinen direkten Beitrag zur Protonentranslokation (Moreno-Vivian et al., 1999). Jedoch in *Pseudomonas* sp. Stamm G-179 katalysiert die Nap den ersten Schritt der Denitrifikation in einem energieliefernden Prozess, obgleich der Mechanismus noch unklar ist (Bedzyk et al., 1999). Auch in *Bradyrhizobium japonicum* und *Wolinella succinogenes* verlieren *napA*-Mutanten die Möglichkeit anaerob mit Nitrat zu wachsen (Delgado et al., 2003; Simon et al., 2003).

Untersuchungen von Promotoraktivitäten (*napF-lacZ*) zeigten, dass die periplasmatische Nitratreduktase in *E.coli* bevorzugt unter geringen Nitratkonzentrationen die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysiert und somit anaerobes Wachstum ermöglicht (Wang et al., 1999; Stewart et al., 2002).

Die zweite dissimilatorische Nitratreduktase ist in der Regel ein Heterotrimer (NarGHI) und auf der cytoplasmatischen Seite membranverankert. Dies geschieht über die NarI-Untereinheit, welche über zwei Häm *b* – Gruppen die benötigten Elektronen aus dem Chinonspeicher an NarH weiterleitet und dabei zwei Protonen ins Periplasma pumpt (Moreno-Vivian et al., 1999). Über vier Fe-S-Zentren werden die Elektronen auf die aktive Untereinheit NarG übertragen, wo am Molybdän der beiden Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid Kofaktoren die eigentliche Reduktion von Nitrat stattfindet (Richardson, 2000). Das Nitrat wird vermutlich über einen Protonengradient-abhängigen  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ -Symport oder einem  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ -Antiport in die Zelle transportiert (NarK). Die Expression der Gene der respiratorischen Nitratreduktase erfolgt meist unter sauerstoff-limitierenden Bedingungen und erfordert in einigen Fällen die weitere Induktion durch Nitrat oder Nitrit.

Als dritte Möglichkeit Nitrat zu Nitrit zu reduzieren nutzt *P. aeruginosa* die cytoplasmatische, assimilatorische Nitratreduktase Nas, wobei das gebildete Nitrit über die assimilatorische Nitritreduktase (NirB) direkt zu Ammonium reduziert wird und dieses als Stickstoffquelle verwendet werden kann.

Im zweiten Schritt der Denitrifikation wird Nitrit zu NO reduziert. Es gibt zwei Typen von respiratorischen Nitritreduktasen, eine kupferhaltige NirK und eine Häm enthaltende NirS. Beide Enzymvarianten sind im Periplasma lokalisiert. Es lässt sich anhand der Phylogenie bislang nicht vorhersagen, ob ein Bakterium NirS oder NirK enthält, es wurden aber bisher nie beide Enzyme in einem Organismus gefunden. NirK bildet Homotrimere mit etwa 40 kDa pro Untereinheit. Jede Untereinheit enthält jeweils ein

Kupferatom. Der zweite Nitritreduktase-Typ NirS wurde bisher in 75 % der untersuchten Bakterien gefunden und ist ein Cytochrom *cd<sub>1</sub>*-Komplex. Er besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit je ca. 60 kDa (Zumft, 1997). Diese *cd<sub>1</sub>*-Nitritreduktase NirS kommt auch in *P. aeruginosa* vor. Sie erhält ihre Elektronen von dem Cytochrom *c<sub>551</sub>* oder von Azurin (Arai *et al.*, 1991, Haas *et al.*, 1992, Canters, 1986).

Das freigesetzte NO, das für die Zelle hoch toxisch ist, wird über die membranständige NO-Reduktase NorCB sofort weiter zu N<sub>2</sub>O umgesetzt. Der heterodimere Cytochrom *bc*-Komplex erhält seine Elektronen vermittelt durch das Häm *c* ebenfalls von Cytochromen im Periplasma.

Die abschließende Reduktion von N<sub>2</sub>O zu N<sub>2</sub> erfolgt an der periplasmatisch lokalisierten N<sub>2</sub>O-Reduktase NosZ. Sie besteht aus einem Homodimer, das in jeder Untereinheit vier Kupferatome enthält (SooHoo und Hollocher, 1991).

Die während der Denitrifikation ins Periplasma translozierten Protonen dienen, durch den Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten (PMF, proton motiv force) und der Bildung einer Potentialdifferenz, der Energiekonservierung.

### 1.5.1 Regulatoren und Regulation der Denitrifikation

Die vier Enzyme Nitratreduktase, Nitritreduktase, NO-Reduktase und N<sub>2</sub>O-Reduktase katalysieren in *P. aeruginosa* die Reduktion von Nitrat zu Stickstoff, welcher neben N<sub>2</sub>O als Atmungsprodukt entweicht (Arai *et al.*, 1997). Die Expression der N-Oxid-Reduktasen steht unter der Kontrolle von bisher fünf bekannten Regulatoren, bzw. Proteinen (Krieger, 2001).

Drei von ihnen, Anr, Dnr, und NarL, messen die für die Denitrifikation relevanten Umweltfaktoren Sauerstoffpartialdruck und die Verfügbarkeit der verwertbaren N-Oxide Nitrat, Nitrit und NO (Hasegawa *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 1999 und 2003; Krieger, 2001). Davon abhängig regulieren sie die Expression der Gene, welche die Information für die dazugehörigen Reduktasen codieren.

Im Fall von NirQ handelt es sich um einen post-translationalen Regulator, welcher vermutlich die Aktivität der Nitrit- und NO-Reduktase beeinflusst (Arai *et al.*, 1999).

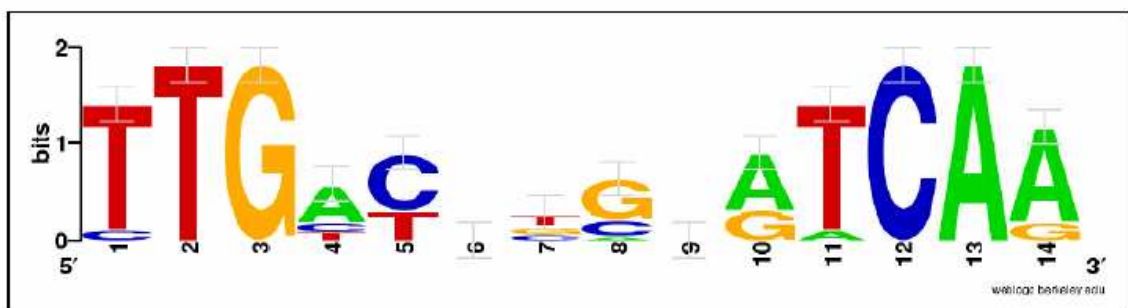
Anr, Dnr, NarL und NirQ bilden eine Regulatorkaskade, in der die Expression fast jedes Regulators von der Aktivierung durch einen oder mehrere der übergeordneten Transkriptionsfaktoren abhängt (Krieger, 2001).

Als fünftes, an der Regulation der Denitrifikation beteiligtes Protein, konnte der DNA-biegende „integration host factor“ IHF identifiziert werden. IHF ist nach bisheriger

Erkenntnis kein Sensor für ein Umweltsignal oder Enzymsubstrat, sondern ermöglicht durch Änderung der DNA-Topologie das Zusammenwirken mehrerer anderer Regulatoren am Promotor (Krieger, 2001).

### 1.5.1.1 Die Fnr-Homologe Anr und Dnr

Der Redox-Regulator Anr („anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction“) ist ein Einkomponenten-Regulationssystem, das sowohl Sensor für den Redoxzustand der Zelle, als auch DNA-bindender Transkriptionsfaktor ist. Das Protein weist 51 % Sequenzidentität auf Aminosäurenebene zum bekannten Fnr („fumarate nitrate reduction“) aus *E. coli* auf (Galimand *et al.*, 1991; Sawers, 1991). Der N-Terminus enthält die vier konservierten Cysteinreste, die in Fnr an der Bildung eines [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt sind. Über die Integrität dieses Fe-S-Zentrums wird der Redoxzustand der Zelle gemessen. Unter oxidierenden Bedingungen wird es über ein [3Fe-4S]- zu einem [2Fe-2S]-Zentrum umgebaut oder ganz zerstört. Das Protein liegt dann als Monomer vor. Unter reduktiven Bedingungen besitzt das Fe-S-Zentrum wieder eine intakte [4Fe-4S]-Struktur und der Regulator geht in seine aktive, DNA-bindende Dimerform über (Sawers *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.*, 1991; Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1996). Bisher ist beschrieben worden, dass *P. aeruginosa* Anr dabei eine ähnliche Sequenz wie Fnr aus *E. coli* (TTGAT NNNN ATCAA) erkennt (Haas *et al.*, 1992; Winteler und Haas, 1996). In unserer Arbeitsgruppe konnte durch theoretische Analysen von 12 verschiedenen experimentell untersuchten Anr-Bindemotiven aus *P. aeruginosa* eine DNA Matrix für die Anr-Bindestelle abgeleitet werden (Münch *et al.*, 2003). Die grafische Darstellung dieser neuen Anr-Konsensussequenz ist in Abb. 4 gezeigt.



**Abb.7: Sequenz-Logo der Anr-Bindestelle in *P. aeruginosa* (unpublished).**

Die Größe der dargestellten Nukleotide gibt die beobachtete Häufigkeit der Nukleotide an der entsprechenden Position an. Das Logo wurde aus den Informationen von 12 in der Literatur beschriebenen Bindestellen erstellt.

Während für *E. coli* eine sehr große Zahl Fnr-regulierter Gene bekannt ist, konnten in *P. aeruginosa* bisher nur wenige Anr-abhängige Gene experimentell identifiziert werden. Dazu gehören die Gene des Arginin Deiminase-Operons *arcDABC* (Galimand *et al.*, 1991), die Denitrifikationsgene *narGHI* (Krieger, 2001), die Gene der Cyanogenese *hcnABC* (Zimmermann *et al.*, 1991), einige Gene der Hämbiosynthese (*hemA*, Krieger *et al.*, 2002; *hem N* und *hemF*, Rompf *et al.*, 1998), die Gene der Cyanid-insensitiven terminalen Oxidase CIO (Cooper *et al.*, 2003), das Azurin-Gen (Vijgenboom *et al.*, 1997) und das *dnr*-Gen (Arai *et al.*, 1997). Weiterhin kontrolliert Anr ein Operon, dessen Gene für eine Phosphotransacetylase (*pta*) und eine Acetatkinase (*ackA*) kodieren. Beide Gene sind essentiell für ein langes Überleben von *P. aeruginosa* während der Pyruvat-Fermentation (Eschbach *et al.*, 2004 a).

Darüber hinaus wurde in *P. aeruginosa* ein zweiter Regulator Dnr („dissimilatory nitrate respiration regulator“) entdeckt, der auf Aminosäureebene Ähnlichkeit zu Anr aufweist. Dnr soll eine ähnliche DNA-Konsensussequenz erkennen wie Fnr und Anr, es fehlen ihm aber die konservierten Cysteinreste für die Bildung des Fe-S-Zentrums (Arai *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Denitrifikationsgene (*nirS*, *norC* und *nosZ*) über eine Anr-Dnr-Kaskade reguliert werden. Dabei nimmt Anr Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes wahr und aktiviert die Transkription von *dnr*. Dnr wiederum reagiert vermutlich auf N-Oxide und aktiviert die Transkription der entsprechenden Zielgene (Arai *et al.*, 1997 und 2003).

### 1.5.1.2 Das Nitratsensorsystem NarXL

NarXL ist ein Zweikomponenten-Regulationssystem, dessen Sensor NarX in der Membran sitzt und bei Vorhandensein von Nitrat in der Umgebung sich selbst phosphoryliert. Dieses autophosphorylierte NarX überträgt seine Phosphatgruppe anschließend auf den Transkriptionsregulator NarL, der dadurch in der Lage ist, an DNA zu binden (Stewart, 1993). *E. coli* NarL erkennt spezifische Sequenzen im Promotorbereich der Zielgene (TACc/tNc/aT, Tyson *et al.*, 1993), bindet aber im Gegensatz zu Anr als Monomer an die DNA. In *E. coli* kommen diese Konsensussequenzen oft als invertierte Wiederholungen vor, die dann aber meist von NarP besetzt werden, einem NarL-Homolog, welches in *P. aeruginosa* nicht vorhanden ist. In *E. coli* übernimmt NarXL die Feinregulierung der von Fnr unter Sauerstoffmangel induzierten Gene. Bei Vorhandensein von Nitrat schaltet es alle anaeroben Funktionen wieder ab, die nicht für die Nitratatmung benötigt werden. Auf der anderen Seite stimuliert es zusätzlich die Transkription der Gene der Nitratammunifikation. So wurde gezeigt, dass die Gene der Fumaratreduktase (Kalman und Gunsalus, 1988 und 1989),

die DMSO/TMAO-Reduktase (Cotter und Gunsalus, 1989), die Formiat-abhängige Nitritreduktase (Hussain *et al.*, 1994), die Alkohol-Dehydrogenase und die Pyruvat-Formiat-Lyase (Kaiser und Sawers, 1995) reprimiert werden, während die Transkription der Gene der Nitratreduktase, der NADH abhängigen Nitritreduktase (Spiro und Guest, 1990) und der Formiat-Dehydrogenase (Darwin und Stewart, 1995) induziert wird. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in *P. aeruginosa* die divergent zu *narXL* orientierten Gene *narK1K2GHJ* (Nitratreduktase) ein Operon bilden und gemeinsam reguliert und transkribiert werden. Auch die *nirQ*-Expression (Regulatorgen) ist ebenfalls stark NarL-abhängig. Auf die Expression der Strukturgene *nirS* und *norCB* scheint das Regulationssystem jedoch keinen Einfluss zu haben (Krieger, 2001).

### 1.5.1.3 Der DNA-biegende „integration host factor“ (IHF)

Das bakterielle IHF ist ein heterodimeres Protein (HimAD), welches durch Bildung höhergeordneter DNA-Strukturen an der Regulation der Expression zahlreicher Gene beteiligt ist (Friedmann, 1988). IHF bindet an die DNA und induziert durch Biegung eine Veränderung der Topologie der DNA. IHF gehört in die Klasse der Histon-ähnlichen Proteine und konnte bisher in vielen Gram-negativen Bakterien nachgewiesen werden. Die zwei Untereinheiten des Proteins werden durch die Gene *himA* und *himD* kodiert. Den Name *integration host factor* hat das Protein daher erhalten, weil es vom Phagen Lambda benötigt wird, um seine DNA in das Chromosom von *E. coli* zu integrieren. Daneben sind mittlerweile viele weitere zelluläre Prozesse außer der Genregulation beschrieben, an denen IHF beteiligt ist. Dazu gehören Rekombination, Transposition, Inversion, Phagen-DNA-Verpackung und Plasmid-DNA-Replikation (Friedmann, 1988). In *P. aeruginosa* konnte ebenfalls ein Protein gereinigt werden, welches als Heterodimer vorliegt und IHF-Aktivität aufweist (Delic-Attree *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass dieses Protein an der Regulation der Alginatbiosynthese (Delic-Attree *et al.*, 1996; Wozniak und Ohman, 1993; Wozniak, 1994) und Hämbiosynthese (Krieger *et al.*, 2002) beteiligt ist.

### 1.5.1.4 Das regulatorische Netzwerk der Denitrifikation

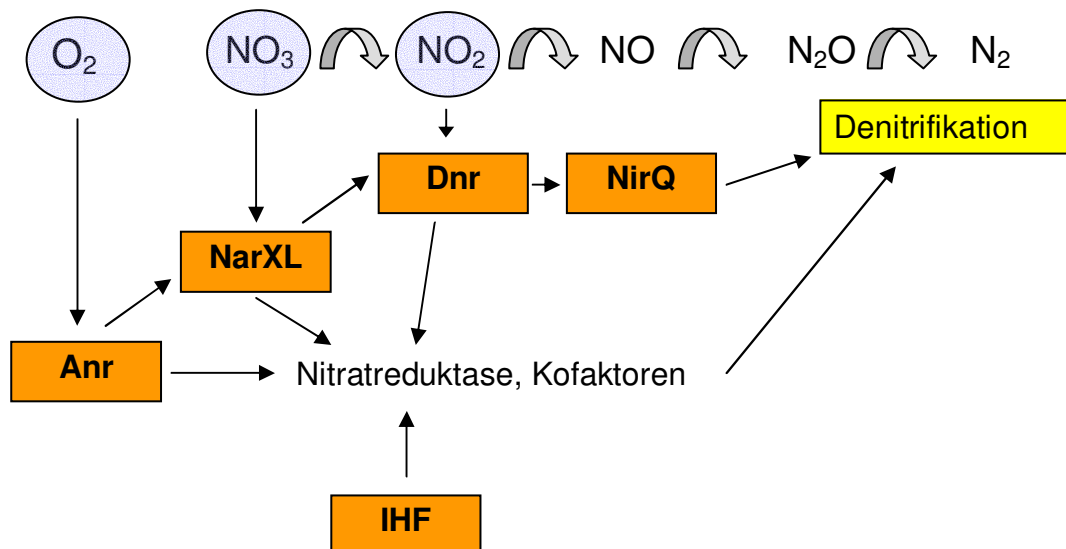
Folgendes regulatorisches Netzwerk zum Anschalten der Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen in *P. aeruginosa* wurde postuliert (Krieger, 2001). An erster Stelle der Kaskade steht Anr, das als Sauerstoffsensor fungiert und direkt oder indirekt für die anaerobe Induktion aller weiteren Denitrifikationsenzyme unerlässlich ist. Das geschieht zum einen über eine direkte Transkriptionsaktivierung der Nitratreduktasegene. Zum

anderen erfolgt eine verstärkte anaerobe Expression von *anr* selbst und den in der Kaskade nachfolgenden Regulatorgenen *narL* und *dnr*.

NarL erlaubt nur in Gegenwart von Nitrat bei gleichzeitiger anaerober Induktion durch Anr die Expression der Nitratreduktase. Außerdem verstärkt NarL die Transkription der Regulatorgene *dnr* und *nirQ*. Damit wird vermutlich eine erhöhte Genexpression der weiteren Denitrifikationsenzyme Nitritreduktase und NO-Reduktase erreicht und eine schnelle Weiterverarbeitung der N-Oxide gewährleistet.

Dnr ist im Gegensatz zu NarL an der Regulation der Expression von Genen mehrerer Denitrifikationsenzyme beteiligt. Neben einem geringen Einfluss auf die Expression der Nitratreduktasegene, der vermutlich nur auf die Ähnlichkeit der Bindestellen von Anr und Dnr zurückzuführen ist, reguliert Dnr entscheidend die Expression der Nitrit- und NO-Reduktasegene. Gleichzeitig wird auch die Transkription des nächsten Regulators *nirQ* kontrolliert. NirQ, das als einziges regulatorisches Protein nur unter anaeroben Bedingungen gebildet wird, scheint als post-translationaler Regulator wichtig für die Aktivierung der Nitritreduktase und der NO-Reduktase zu sein (Arai et al., 1999).

Die Expression der Gene der  $N_2O$ -Reduktase ist ebenfalls Dnr-abhängig und wird über die Dnr-Anr-Kaskade reguliert (Arai et al., 2003). Als Umweltsignal für die Aktivierung durch Dnr konnte NO identifiziert werden,  $N_2O$  bewirkt keine Induktion. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Nitrit nur über das daraus enzymatisch gebildete NO ebenfalls einen positiven Effekt auf die Promotoraktivität ausübt (Arai et al., 2003).



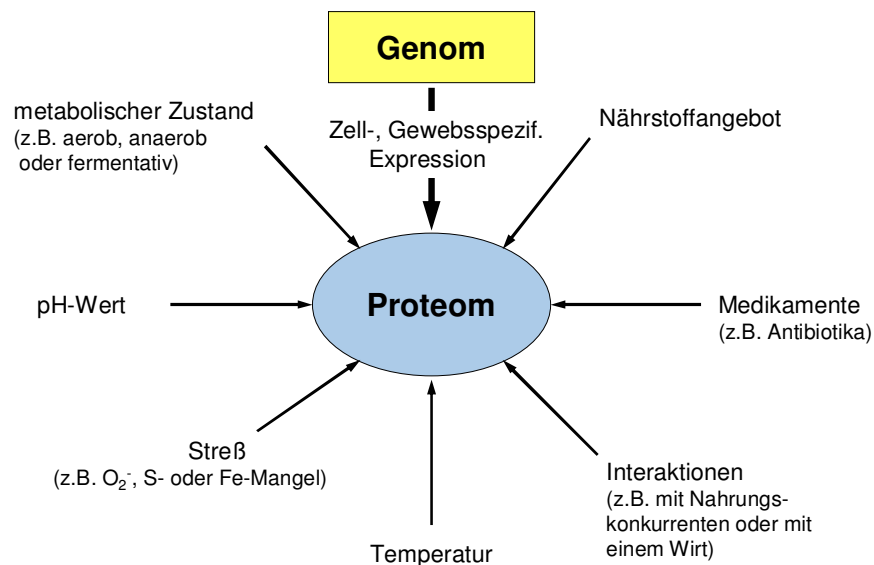
**Abb.8: Modell des regulatorischen Netzwerkes zum Initiieren der Denitrifikation in *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen.** Die vier Regulatoren Anr, Dnr, NirQ und IHF, sowie das Nitratsensorsystem NarXL sind orange unterlegt und die aktivierenden Signale blau dargestellt.



## 1.6 Proteomanalyse

Der Begriff "Proteom" wurde im Jahre 1996 durch Marc Wilkins und Keith Williams geprägt (Wilkins *et al.*, 1996). Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt einer Zelle oder eines Organismus unter definierten Bedingungen gebildet werden.

Im Gegensatz zum statischen Genom ist das Proteom in Abhängigkeit von inneren und äußeren Parametern eine dynamische und flexible Größe. Unterschiedliche Kulturbedingungen oder Temperaturen, Stress, Interaktionen mit anderen Zellen, Einwirkungen von Medikamenten und der metabolische Zustand der Zelle haben großen Einfluss auf die Proteinsynthese (Abb. 6) (Lohaus und Meyer, 1998). Für die Proteomanalyse ist demnach die genaue Definition der Ausgangsbedingungen eine unverzichtbare Voraussetzung.



**Abb.9: Das Proteom als dynamisches Gebilde unter dem Einfluss zahlreicher Parameter** (modifiziert nach Lohaus und Meyer, 1998, Eschbach, 2004 b).

Die durch diese Einflüsse aktivierten Regulationsmechanismen einer jeden Zelle, entscheiden über die Expression eines Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt und damit über die Bildung eines RNA-Transkriptes und schließlich über die Synthese eines Proteins. Es ist nicht davon auszugehen, dass Zellen existieren, die zu einem Zeitpunkt alle vorhandenen Gene exprimieren. Aus diesem Grund liegt in jeder Zelle zu einem definierten Zeitpunkt immer nur ein Teil des Proteoms vor.

Die Proteomforschung (Proteomics), wie sie heute betrieben wird, wurde erst durch umfangreiche Erkenntnisse der Genomforschung im Rahmen der Genomsequenzierungsprojekte ermöglicht. Neben der Proteomforschung ist eine zweite relativ junge Forschungsrichtung zu nennen, die Transkriptomanalyse. Das Transkriptom stellt die Gesamtheit der von einer Zelle oder einem Gewebe exprimierten messenger-RNA's dar. Sowohl Transkriptom- als auch Proteomanalyse weisen entscheidende Vorteile, aber auch Nachteile gegenüber dem jeweils anderen Forschungsansatz auf.

Ein unbestrittener Vorteil der Transkriptomanalyse ist die, sofern erst einmal ein geeigneter Chip etabliert wurde, überragend schnelle und simple Identifizierung aller zum Zeitpunkt der Probenentnahme transkribierten Gene. Die RNA-Expressionsanalyse mit Hilfe eines solchen Chips ist relativ schnell durchzuführen und eine Identifizierung der entsprechenden Gene erfordert dann keinerlei weitere Analysen mehr. Mit einem einzigen Experiment lässt sich damit eine Aussage über die Expression aller Gene treffen. Bei der Proteomanalyse hingegen muss jedes einzelne Protein zunächst massenspektroskopisch analysiert und mit den gewonnenen Daten identifiziert werden. Einen weiteren entscheidenden Vorteil der Transkriptomanalyse stellt die apparative Zugänglichkeit aller Transkripte dar. In der Proteomanalyse, deren mit Abstand wichtigste Untersuchungsmethode heute die zweidimensionale Gelelektrophorese ist, kann dagegen ein gewisser Anteil der Proteine bis heute der Untersuchung nicht zugänglich gemacht werden. Ein Grund hierfür ist die hohe Hydrophobizität zahlreicher Proteine. Unter den bis heute entwickelten methodischen Bedingungen der 2D-Gelelektrophorese kann ein Teil des Proteoms bisher nicht geeignet für eine Untersuchung solubilisiert werden und ist somit nicht verfügbar. Ähnliches gilt für diejenigen Proteine, deren Kopienzahl in der Zelle so gering ist, dass sie in der Proteomforschung nicht nachgewiesen werden können.

Trotz der genannten Nachteile der Proteomanalyse gegenüber der Transkriptomanalyse bleibt die Erforschung des Proteoms zum Verständnis der Vorgänge in der Zelle unverzichtbar, weil nur die Proteomanalyse das Verständnis zahlreicher Vorgänge ermöglicht. Das Transkriptom kann hier trotz seiner guten methodischen Zugänglichkeit stets nur indirekte Daten liefern.

Dies wird deutlich, wenn man den biologischen Informationsfluss vom Gen zum funktionstüchtigen Protein betrachtet. Komplexe Prozesse wie die Transkription der DNA-Sequenz, die Translation der mRNA in Protein, dessen Transport zum Wirkungsort, die post-translationale Modifikation und der Abbau des Proteins werden durchlaufen. Die Menge an Proteinen in der Zelle sowie die Modifikation eines Proteins kann nicht

automatisch vom Gen oder der mRNA abgeleitet werden, sondern hierzu sind proteinspezifische Untersuchungen erforderlich.

Schließlich ist es bei der Proteomanalyse auch noch möglich, durch Fraktionierung der untersuchten Extrakte die Lokalisation von Proteinen in bestimmten Zellkompartimenten zu ergründen. Ebenfalls eine Information, die sich anhand von reinen Nukleinsäuresequenzen nur in einigen Fällen aufgrund von detektierten Signalpeptiden oder Transmembrandomänen gewinnen lässt.

Die Methode der denaturierenden zweidimensionalen Proteingelelektrophorese ist heute in der Proteomforschung die Methode der Wahl. Seit ihrer erstmaligen Beschreibung im Jahre 1975 (O'Farrel, 1975) hat sie zahlreiche Weiterentwicklungen und Verbesserungen erfahren. Insbesondere die Entwicklung der immobilisierten pH-Gradienten (Bjellqvist *et al.*, 1982) hat gegenüber den zuvor eingesetzten Trägerampholyten zu entscheidenden Verbesserungen der Reproduzierbarkeit der Gele geführt (Görg *et al.*, 1991, Blomberg *et al.*, 1995).

Dennoch stößt die Proteomforschung permanent auch an die Beschränkungen dieser Methode. Zwar wurden die zur Auftrennung zur Verfügung stehenden pH-Bereiche erweitert und die Möglichkeit der Proteinsolubilisierung immer weiter optimiert, doch die Probleme der Unzugänglichkeit sehr hydrophober, sowie in geringer Kopienzahl in der Zelle vorhandener Proteine konnten bisher nicht zufrieden stellend gelöst werden (Wilkins *et al.*, 1998).

Die Proteomforschung unter Verwendung dieser Methode ist heute in der Lage, eine Vielzahl von funktionellen Fragen bei der Untersuchung biologischen Materials zu beantworten und fundierte Daten für die überwiegende Mehrheit aller in einem Organismus synthetisierten Proteine zu liefern.

### 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Durch Proteomanalysen von *P. aeruginosa* Wildtyp-Zellen und Mutanten, welche defekt sind in der Synthese von Regulatoren des anaeroben Stoffwechsels (NarL, Anr, Dnr), sollten dazugehörige Regulons initial definiert werden. Dabei sollten bestehende Regulationsmodelle überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden. Weiterhin galt es neue Proteine, bzw. Gene zu identifizieren, deren Expression durch diese Regulatoren beeinflusst wird.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der periplasmatischen Nitratreduktase NapABC und der cytoplasmatische Nitratreduktase NarGHI von *P. aeruginosa*. Nach der Herstellung der entsprechenden chromosomalen Mutanten in zugehörigen Genen, sollte die physiologische Funktion der periplasmatischen Nitratreduktase näher untersucht und die Bedeutung beider Reduktasen während der Biofilmbildung aufgeklärt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

Tab.1: Beschreibung der verwendeten *Escherichia coli* Bakterienstämme und deren Herkunft.

| Stamm              | Beschreibung   | Referenz / Quelle          |
|--------------------|--|----------------------------|
| DH10B              | $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 \Delta(ara, leu)$ | GibcoBRL (Invitrogen)      |
| DH5 $\alpha$       | $F \lambda^- supE44 \Delta(argF-lac)U169 \phi 80 dlacZ\Delta M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1$             | Hanahan, 1983              |
| SM10               | 7697 $galU galK \lambda^- rpsL nupG thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu (Km^R)$                        | De Lorenzo & Timmis, 1994  |
| S17 $\lambda$ -pir | $Tp^R Sm^R recA pro thi hsdR^+ RP4-2-Tc::Mu::Km::Tn7 \lambda pir$  | Simon <i>et al.</i> , 1983 |

Tab.2: Beschreibung und Herkunft der verwendeten *Pseudomonas aeruginosa* Bakterienstämme.

| Stamm   | Beschreibung  | Referenz / Quelle         |
|---------|---|---------------------------|
| PAO1    | <i>P. aeruginosa</i> Wildtyp  | Dunn & Holloway, 1971     |
| PA06261 | PAO1 $\Delta anr$   | Ye <i>et al.</i> , 1995   |
| PA09104 | PAO1 $narL::cat, Cm^R$  | Krieger, 2001             |
| RM536   | PAO1 $dnr::tet, Tc^R$   | Arai <i>et al.</i> , 1995 |
| PANQ01  | PAO1 $\Delta napABCDEFGG::aacCI, Gm^R$  | Diese Arbeit              |
| PANQ02  | PAO1 $\Delta napABCDEFGG$ , PANQ01 nach Behandlung mit Flp-Rekombinase                      | Diese Arbeit              |
| PANQ03  | PAO1 $\Delta narGHIJ::aacCI, Gm^R$  | Diese Arbeit              |
| PANQ04  | PANQ02 $\Delta narGHIJ::aacCI, Gm^R$  | Diese Arbeit              |
| PANQ05  | PAO1 $\Delta narGHIJ$ , PANQ03 nach Behandlung mit Flp-Rekombinase                          | Diese Arbeit              |
| PANQ06  | PAO1 $\Delta narGHIJ$ und $\Delta napABCDEFGG$ , PANQ04 nach Behandlung mit Flp-Rekombinase | Diese Arbeit              |
| PANQ07  | $Ap^R, Gm^R$ , PAO1 mit pNQ03 (pMH305- <i>napE<sub>P</sub>-gfp</i> )                        | Diese Arbeit              |

|        |   |              |
|--------|---|--------------|
| PANQ08 | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , PAO1 mit pNQ04 (pMH305- <i>nark<sub>P</sub>-gfp</i> )                                     | Diese Arbeit |
| PANQ09 | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , PAO1 mit pMH305   | Diese Arbeit |
| PANQ10 | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , PAO1 mit pNQ05 (mini-CTX-2- <i>napE<sub>P</sub>-gfp</i> ) in <i>attB</i> Locus integriert | Diese Arbeit |
| PANQ11 | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , PAO1 mit pNQ06 (mini-CTX-2- <i>nark<sub>P</sub>-gfp</i> ) in <i>attB</i> Locus integriert | Diese Arbeit |
| PANQ12 | PANQ10 nach Behandlung mit Flp-Rekombinase  | Diese Arbeit |
| PANQ13 | PANQ11 nach Behandlung mit Flp-Rekombinase  | Diese Arbeit |

## 2.2 Vektoren

Tab.3: Beschreibung der verwendeten Plasmide und deren Herkunft.

| Plasmid                        | Beschreibung  | Referenz/ Quelle                |
|--------------------------------|---|---------------------------------|
| mini-CTX- <i>lacZ</i>          | Tc <sup>R</sup> ; enthält <i>lacZ</i> -Gen für Reportergenfusionen  | Becher & Schweizer, 2000        |
| mini-CTX-2                     | Tc <sup>R</sup> ; selbst integrierender Vektor mit <i>attP</i> -Sequenz und <i>MCS</i> , welche beide von FRT-Bindestellen flankiert sind                               | Hoang <i>et al.</i> , 2000      |
| pEX18Ap                        | Ap <sup>R</sup> ; <i>oriT<sup>+</sup> sacB<sup>+</sup></i> ; "gene replacement"-Vektor mit <i>MCS</i> von pUC18   | Hoang <i>et al.</i> , 1998      |
| pFLP2                          | Ap <sup>R</sup> ; Flp-Rekombinase kodierendes Plasmid   | Hoang <i>et al.</i> , 1998      |
| pPS858                         | Ap <sup>R</sup> ;Gm <sup>R</sup> , Plasmid mit Gentamycin-GFP-Kassette ( <i>aacC1-GFP</i> ), welche von FRT-Bindestellen flankiert ist                                  | Hoang <i>et al.</i> , 1998      |
| pHA541                         | <i>Pseudomonas</i> -Vektor der Inkompatibilitätsgruppe IncQ, mit <i>P. aeruginosa</i> <i>dnr</i> , Ap <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup>                                    | Arai <i>et al.</i> , 1997       |
| pLAFR3                         | Tc <sup>R</sup> , mobilisierbarer Vektor mit breitem Wirtsspektrum. Die <i>cos</i> -Stelle ermöglicht das Verpacken von 38-52 kb großen DNA-Fragmenten in Lambda-Phagen | Staskawicz <i>et al.</i> , 1987 |
| pNQ07                          | pLAFR3 mit 20 kb uncharakterisierten DNA-Fragment aus <i>P.aeruginosa</i> . Komplementiert die Mutante PA09104 und enthält vermutlich <i>narL</i> .                     | Diese Arbeit                    |
| pMEP7                          | Tc <sup>R</sup> , mini-CTX- <i>lacZ</i> mit <i>napE</i> -Promotor (927 bp)  | Diese Arbeit                    |
| pMEP9                          | Tc <sup>R</sup> , mini-CTX- <i>lacZ</i> mit <i>nark</i> -Promotor (400 bp)  | Diese Arbeit                    |
| pQF- <i>nark</i> <sub>14</sub> | pQF50 mit <i>nark</i> -Promotor (400 bp)  | Krieger, 2001                   |
| pQF50                          | Promotor-Testvektor ( <i>lacZ</i> ) mit breitem Wirtsspektrum, Ap <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup>  | Farinha & Kropinski, 1990       |
| pMH305                         | Ap <sup>R</sup> ;Gm <sup>R</sup> , enthält <i>gfp</i> für Reportergenfusion; basierend auf pUCP22Not  | Dr. M. Hentzer                  |

|           |   |                          |
|-----------|---|--------------------------|
| pUCP22Not | Ap <sup>R</sup> ;Gm <sup>R</sup> , für <i>Pseudomonas</i> geeigneter Übertragungs- und Klonierungs-Vektor   | Herrero et al, 1990      |
| pAKN68    | Gm <sup>R</sup> , enthält mini-Tn7-Transposon, Trägerplasmid  | Dr. M. Hentzer           |
| pAKN66    | Ap <sup>R</sup> , pUX-BF13, Helferplasmid   | Dr. M. Hentzer           |
| pUX-BF13  | Ap <sup>R</sup> , enthält die für die Insertion des mini-Tn7-Transposons notwendigen Tn7-Transposase-Gene <i>tnsABCDE</i>   | Bao <i>et al.</i> , 1991 |
| pNQ01     | Ap <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup> ; pEX18Ap mit 849 bp PCR-Produkt stromabwärts von <i>napC</i> , Gm <sup>R</sup> aus pPS858 und 650 bp Promotorbereich von <i>napE</i> , Fragmente über <i>Pst</i> I-Schnittstelle eingefügt           | Diese Arbeit             |
| pNQ02     | Ap <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup> ; pEX18Ap mit 717 bp PCR-Produkt stromabwärts von <i>narI</i> , Gm <sup>R</sup> aus pPS858 und 716 bp PCR-Produkt stromaufwärts von <i>narG</i> , Fragmente über <i>Pst</i> I-Schnittstelle eingefügt | Diese Arbeit             |
| pNQ03     | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , pMH305 mit <i>napE</i> -Promotor (927 bp) aus pMEP7, zwischen <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI kloniert  | Diese Arbeit             |
| pNQ04     | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , pMH305 mit <i>nark</i> -Promotor (400 bp) aus pMEP9, zwischen <i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I kloniert   | Diese Arbeit             |
| pNQ05     | Tc <sup>R</sup> , mini-CTX-2 mit <i>napE</i> -Promotor (927 bp) aus pMEP7, über <i>Not</i> I-Schnittstelle eingefügt  | Diese Arbeit             |
| pNQ06     | Tc <sup>R</sup> , mini-CTX-2 mit <i>nark</i> -Promotor (400 bp) aus pMEP9, über <i>Not</i> I-Schnittstelle eingefügt  | Diese Arbeit             |

(Fortsetzung Tab.3)

## 2.3 Kulturmedien und Zellzüchtung

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter der Firma Millipore GmbH (Eschborn); Porengröße 0,2 µm), Glaswaren wurden für mindestens 3 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert.

### 2.3.1 Komplexmedium

Als Komplexmedium wurde für alle Bakterien modifiziertes LB (Luria Bertani) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

LB-Medium (modifiziert): 10 g/l Trypton  
5 g/l Hefe-Extrakt  
5 g/l NaCl

Für feste Medien wurden 15 g Agar pro Liter zugesetzt.

### 2.3.2 Minimalmedien

Für definierte Wachstumsbedingungen wurde das Minimalmedium AB benutzt (Clark und Maaløe, 1967). Alle Substanzen wurden in Reinstwasser angesetzt.

|                           |  |
|---------------------------|--|
| 1l AB Medium besteht aus: | 100 ml A10                                     |
|                           | 20 mM Glukose                                  |
|                           | 100 $\mu$ M $\text{CaCl}_2$                    |
|                           | 1 mM $\text{MgCl}_2$                           |
|                           | 1 ml Spurenelemente                            |
|                           | 7 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
|                           | 50 mM $\text{NaNO}_3$                          |

|      |  |
|------|--|
| A10: | 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                        |
|      | 90 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
|      | 30 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            |
|      | 30 g/l $\text{NaCl}$                                       |

|                 |  |
|-----------------|--|
| Spurenelemente: | 200 mg/l $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
|                 | 200 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
|                 | 20 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   |
|                 | 20 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  |
|                 | 20 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  |
|                 | 10 mg/l $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  |
|                 | 5 mg/l $\text{H}_3\text{BO}_3$                     |

### 2.3.3 Medienzusätze

Zusätze wie Kohlenstoffquellen, Aminosäuren und Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen in reinst.  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt und sterilfiltriert. Die Substanzen wurden den sterilisierten, auf etwa 50 °C abgekühlten Medien, zugesetzt.

Für denitrifizierendes Wachstum wurden dem Medium 50 mM  $\text{KNO}_3$  oder 10 mM  $\text{NaNO}_2$  zugesetzt.

Um  $\text{LacZ}^+$ -Kolonien auf Agarplatten identifizieren zu können, wurde dem Medium 2 ml/l einer XGal-Lösung (20 mg/ml in DMF) zugefügt.

Für die Selektion auf die *P. aeruginosa*-Zellen, in denen das *sacB*-Gen abwesend ist, wurden LB-Agarplatten mit 5 % (w/v) Saccharose verwendet.

Die verwendeten Endkonzentrationen für Antibiotika sind der Tab.4 zu entnehmen:



Tab.4: Verwendete Antibiotika-Endkonzentrationen

| Antibiotika     | Stammlösung                            | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
|-----------------|--|----------------|----------------------|
| Ampicillin      | 50 mg/ml in dH <sub>2</sub> O          | 100 µg/ml      | -                    |
| Carbenicillin   | 100 mg/ml in dH <sub>2</sub> O         | -              | 500 µg/ml            |
| Chloramphenicol | 34 bzw. 100 mg/ml in Ethanol           | 34 µg/ml       | 500 µg/ml            |
| Gentamycin      | 30 mg/ml in dH <sub>2</sub> O          | -              | 200 µg/ml            |
| Tetracyclin     | 10 bzw. 200 mg/ml in Ethanol (50%)     | 5 µg/ml        | 200 µg/ml            |
| Streptomycin    | 10 bzw. 200 mg/ml in dH <sub>2</sub> O | 10 µg/ml       | 200 µg/ml            |
| Spectinomycin   | 10 bzw. 200 mg/ml in dH <sub>2</sub> O | 10 µg/ml       | 200 µg/ml            |

### 2.3.4 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden einer Bakterienkultur Aliquots entnommen und im Photometer die optischen Dichte bei 578 nm bestimmt, wobei davon ausgegangen wurde, dass einer OD<sub>578</sub> von 1 eine Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Zellen pro ml entspricht.

### 2.3.5 Wachstumsbedingungen

Aerobe Bakterienkulturen wurden bei 37 °C in Schikanekolben bei 200 rpm geschüttelt oder mit Hilfe von Reagenzglasschüttlern inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden entsprechend den Experimenten variiert und sind jeweils angegeben.

Anaerobe Bakterienkulturen wurden aerob inokuliert und dann in druckbeständigen Glasflaschen mit Silikongummistopfen ebenfalls bei 37 °C inkubiert. In Vergleichsexperimenten wurde mittels einer Sauerstoffelektrode festgestellt, dass nach dem Transfer einer exponentiell wachsenden aeroben Kultur in anaerobe Bedingungen der Sauerstoff nach 5 bis 10 min komplett verbraucht war.

Bei Umschichtungsexperimenten (Shift-Experimenten) wurden die Zellen aerob bis zu einer bestimmten optischen Dichte in Erlenmeyerkolben herangezogen, anschließend wurden die Bakteriensuspension in Glasflaschen mit Silikonstopfen überführt und einige Stunden anaerob inkubiert. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass das Medium einen alternativen Elektronenakzeptor, z.B. Nitrat, für das anaerobe Wachstum enthält.

## 2.4 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden entweder 850 µl von einer Bakterien-Übernachtskultur mit 150 µl sterilem 100 %igem Glycerin gemischt, oder die Bakterien wurden mit einer Impföse von einer Agarplatte steril abgenommen und in 1 ml LB mit 15 % Glycerin suspendiert und bei -80 °C gelagert.

## 2.5 DNA-Isolierung

### 2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus *P. aeruginosa*

Zur Präparation chromosomaler DNA wurden 4 ml einer Übernachtskultur vom *P. aeruginosa* bei 13000 rpm und 4 °C für 2 min in einer Biofuge fresco von Heraeus (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 700 µl GTE-Lösung (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde mit 700 µl Chloroform-Phenol (1:1) versetzt, gut gemischt und 10 min bei 4 °C bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und noch 2 weitere Male mit Chloroform-Phenol behandelt, solange bis nach der Zentrifugation keine Interphase mehr zu sehen war. Anschließend einmal nur mit Chloroform extrahieren und den Überstand mit 60 µl 3M Natriumacetat-Lösung und 700 µl Isopropanol mischen. Nach 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 13 000 rpm in der Biofuge wurde das Sediment mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde nochmals für 10 min zentrifugiert und das Sediment in 100 µl Wasser bei 50 °C inkubiert. Vollständig löste sich dieses über Nacht bei 4 °C.

### 2.5.2 Plasmidpräparation aus *E. coli* und *P. aeruginosa*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden 4 ml einer Übernachtskultur mit entsprechendem Antibiotikum bei 13000 rpm und 4 °C für 2 min in einer Biofuge fresco von Heraeus (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl eiskalter GTE-Lösung (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 und 100 µg/ml RNase) resuspendiert, anschließend mit 400 µl NaOH/SDS (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt, fünf mal kurz invertiert und 3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl eiskalter 3M Natriumacetat-Lösung pH 4,8 und 3 min Inkubation wurde das Gemisch bei 13000 rpm und 4 °C in der Biofuge 5 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 600 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Chloroform-Phenol (1:1) versetzt, gut gemischt und 2 min bei 4 °C bei 13000 rpm zentrifugiert. Nachdem man die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführte, wurden 600 µl Isopropanol zugegeben, gut gemischt und kurz inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde der Überstand entfernt und das Sediment gut getrocknet. Zum Waschen des Sediments wurden 1 ml 70%-iges Ethanol zugesetzt und nach erneuter Zentrifugation muss das Sediment gut getrocknet werden. Durch Zugabe von 50 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) löste sich die Plasmid-DNA vollständig. Die Lagerung erfolgt bei –20 °C.

## 2.6 Fällung von DNA

Nach der Zugabe von 0,1 Volumenanteile 3M Natriumacetat-lösung pH 4,8 und 2,5 Volumenanteile 100%-iges Ethanol zur DNA-Lösung wurde diese 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend erfolgte ein 30 min Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  in der Biofuge von Heraeus (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Dem Sediment wurden 500  $\mu\text{l}$  70%-iges Ethanol zugegeben, gut gemischt und 20 min bei  $50^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm und Raumtemperatur bildete sich erneut ein Sediment, welchen dann in 10  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst wurde.

## 2.7 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm und zur Kontrolle auf Proteinverunreinigung bei 280 nm. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm wurde dabei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dsDNA gleichgesetzt. Die Reinheit der DNA-Lösung ergab sich aus dem Quotienten zwischen  $E_{260}$  und  $E_{280}$  ( $E_{260} / E_{280} > 1,8$  für reine DNA).

## 2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der PCR-Technik wurden verschiedene Gene bzw. Promotorsequenzen direkt aus dem *P. aeruginosa* Chromosom amplifiziert.

Pro 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz wurden etwa 10 ng chromosomale DNA, 5  $\mu\text{l}$  10x PCR-Puffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), je 20 pmol Primer, 200  $\mu\text{M}$  dNTP's und 0,5 Units *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Bei unbefriedigenden Ausbeuten an PCR-Produkt wurde durch Variation der  $\text{MgCl}_2$  Konzentration (2,5 – 4,5 mM) oder Zugabe von 3 % (v/v) DMSO versucht, die Ausbeute zu erhöhen. Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm in einem PCR-Cycler durchgeführt: 5 min Denaturierung der chromosomalen DNA bei  $98^{\circ}\text{C}$ , gefolgt von 30 Zyklen mit je 1-minütiger Denaturierung bei  $96^{\circ}\text{C}$ , 1-minütiger Hybridisierung der Primer bei der primerabhängigen Temperatur und je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes die 1 – 3-minütiger Kettenverlängerung bei  $72^{\circ}\text{C}$ . Der letzte 5-minütige Schritt bei  $72^{\circ}\text{C}$  diente der vollständigen Synthese des Gegenstrangs. Diesen 30 Zyklen folgte, bis zur Entnahme der Ansätze, die Kühlung bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Die PCR-Produkte wurden standardmäßig mit dem PCR Purification Kit (Firma Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers für die weiteren Reaktionen aufgereinigt.

PCR-Master-Mix:            50  $\mu\text{l}$  10x PCR-Puffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)  
                                  10  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP's  
                                  420  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

|             |                                 |
|-------------|---------------------------------|
| PCR-Ansatz: | 48 µl Master-Mix                |
|             | 1 µl genom. DNA (11 ng/µl)      |
|             | 1 µl Primer-Mix (je 20 pmol/µl) |
|             | 1 µl Taq-DNA Polymerase (0,5 U) |

## **2.9 Enzymatische Modifizierungen von DNA**

### **2.9.1 Restriktion von DNA**

Das Schneiden von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben der Hersteller (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot und NEB New England Bio Labs GmbH, Beverly, Massachusetts, USA). Die Inkubationsdauer bei 37 °C lag zwischen 2 und 4 Stunden.

Die Ansätze wurden anschließend mit dem PCR Purification Kit (Firma Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### **2.9.2 Dephosphorylierung**

Zur Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wurden die Restriktionsansätze mit SAP (3,5 Units) 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach 15-minütiger Inaktivierung der SAP bei 65 °C wurden die DNA-Fragmente mit dem PCR Purification Kit (Firma Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt.

### **2.9.3 Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (1 Unit pro 10 µl Ansatz) und im entsprechenden Ligationspuffer nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die DNA, welche in das Plasmid integriert werden sollte, im Gegensatz zur Plasmid-DNA, im Überschuss eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 17 °C für 12 – 24 h.

## **2.10 Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch mit Hilfe von Agarose-Gelen (0,8-1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer) aufgetrennt. Zur Verfolgung der elektrophoretischen Auftrennung und um die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen, wurde diese vor dem Auftragen auf das Gel mit dem „Loading Dye“ der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) gemischt. Als Größenvergleich diente der DNA-Marker „Gene Ruler DNA ladder mix“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Zum Sichtbarmachen der DNA wurde das Gel nach der Elektrophorese für 15 – 20 Minuten in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) inkubiert und unter UV-Belichtung bei 266 nm dokumentiert. Die Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte nach der elektrophoretischen Trennung. DNA Fragmente von Interesse

wurden unter möglichst kurzzeitiger UV-Exposition ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

TAE-Puffer (pH 8,5): 40 mM Tris-Acetat  
1 mM EDTA

### 2.11 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

#### 2.11.1 *Escherichia coli*

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur von einer Einzelkolonie *E. coli* DH10B oder S17  $\lambda$ -pir aerob bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Von dieser wurde eine 500 ml Flüssigkultur LB mit einer  $OD_{578} = 0,05$  angesetzt und bis zu einer  $OD_{578}$  von etwa 0,5 bis 0,6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde auf Eis 15 min abgekühlt und anschließend zentrifugiert (4300 rpm; 15 min; 4 °C; Heraeus Megafuge 1.0 R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Das Bakteriensediment wurde in 500 ml eiskaltem sterilen Wasser resuspendiert und zentrifugiert (4300 rpm; 15 min; 4 °C; Heraeus Megafuge 1.0 R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Die Zellen wurden noch ein weiteres Mal wie beschrieben mit eiskaltem Wasser gewaschen, danach in 20 ml 10 %-igen Glycerin resuspendiert und zentrifugiert (4300 rpm; 15 min; 4 °C; Heraeus Megafuge 1.0 R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Abschließend wurden die Zellen in 1 ml 10%-igem Glycerin gelöst. Die Zellen wurden entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder in 40  $\mu$ l Aliquots bei –80 °C gelagert.

Die kompetenten Zellen wurden über Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) mit Hilfe eines Gene Pulser<sup>TM</sup> (Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA) transformiert. Dazu wurden 40  $\mu$ l der *E. coli* Zellen und 0,25 – 1  $\mu$ g Plasmid-DNA in eine 2 mm Transformationsküvette überführt und im Gene Pulser<sup>TM</sup> elektroporiert (2.5 kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F). Anschließend wurden die transformierten Zellen zur Regeneration in 1 ml LB-Medium 1 bis 2 h bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Von den Ansätzen wurden 100 bis 200  $\mu$ l auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.11.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Zur Herstellung von kompetenten Zellen von *P. aeruginosa* wurde der Stamm aus der Glycerinkultur fraktioniert auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde dann auf einer frischen LB-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37 °C für maximal 16 h inkubiert. Von der Platte wurde mit einer sterilen Impföse etwas Bakterienmaterial abgenommen, in 500  $\mu$ l sterilem reinst. H<sub>2</sub>O

resuspendiert und 1 min bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal gewaschen, bevor sie in 50 µl reinst. H<sub>2</sub>O resuspendiert und für die Transformation eingesetzt wurden.

Für die Transformation wurden die kompetenten *P. aeruginosa* Bakterien (50 µl) und die Plasmid-DNA in 1 mm Elektroporationsküvetten überführt und bei 1,9 kV, 200 Ω und 25 µF im Gene Pulser<sup>TM</sup> von BioRad (Hercules, Kalifornien, USA) elektroporiert. Nach der anschließenden Regenerationsphase von 1 – 2 h bei 37 °C und 300 rpm wurden 100 bis 200 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei Transformationen, bei denen zwei verschiedene Antibiotikaresistenzen in die Bakterien eingebracht wurden, betrug die Regenerationsphase 2 h.

### **2.11.3 Zweipunktkreuzung („diparental mating“) zur Transformation von *P. aeruginosa***

*E. coli* S17λ-pir enthält die für eine Konjugation notwendigen *tra*-Gene. Dadurch kann ein Vektor aus *E. coli* S17λ-pir durch eine Konjugation in *P. aeruginosa* eingebracht werden. Dazu wurden Übernachtskulturen von *E. coli* S17λ-pir mit dem Vektor und entsprechenden Antibiotika und von *P. aeruginosa* bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Für die Zweipunktkreuzung wurden entsprechende Volumina von *E. coli* Übernachtskultur und von der *P. aeruginosa* Übernachtskultur für je 1 min bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden in je 50 µl LB resuspendiert, vereinigt, als Tropfen auf eine LB-Agar-Platte gegeben, 1 h getrocknet und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Während dieser Zeit wird das mobilisierbare Plasmid von *E. coli* in *P. aeruginosa* übertragen. Die Bakterien wurden am nächsten Tag mit 1 ml LB von der Platte geschwemmt, resuspendiert und 100 – 400 µl der Zellsuspension wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion von *P. aeruginosa* mit Plasmid ausplattiert und bei 37 °C für 24 – 48 h inkubiert. Die Platten enthielten zusätzlich 10 µg/ml Chloramphenicol, um das Wachstum des *E. coli* S17λ-pir Donorstammes zu hemmen.

### **2.11.4 Isolierung eines Cosmides aus einer *P. aeruginosa*-Genbank**

Durch Komplementation der Mutanten mit einer Cosmid-Genbank aus *P. aeruginosa* ATCC 17933 (Schobert, 1999) können Cosmide isoliert werden, die einen Wachstumsdefekt einer Mutante komplementieren. Die Genbank wurde von Max Schobert während seiner Dissertation angefertigt und zur Verfügung gestellt (Schobert, 1999).

Für die Herstellung der Genbank wurde der Cosmidvektor pLAFR3 verwendet. Dieser Vektor ist ein 22 kb großer, mobilisierbarer Vektor mit breitem Wirtsspektrum und die enthaltene *cos*-Stelle ermöglicht das Verpacken von 38-52 kb großen DNA-Fragmenten in Lambda-Phagen. Aufgrund der Größe des Vektors sollte die Insert-DNA 16-30 kb lang sein. Als Träger für die Genbank wurde *E.coli* S17 $\lambda$ pir gewählt, da der Stamm die zur Konjugation notwendigen *tra*-Gene enthält und für die Zweipunktkreuzung geeignet ist (Schobert, 1999).

Für die Komplementation der hergestellten Nitratreduktase-Mutanten wurde ein Cosmid benötigt, welches die Information der Nitratreduktase NarGHIJ enthält. Da das Operon dieser Nitratreduktase *narK<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHIJ* direkt stromaufwärts des *narXL*-Operons liegt, wurde die *narL*-Mutante (Krieger, 2001) für die Gewinnung des komplementierenden Cosmides genutzt.

Nach der Zweipunktkreuzung (Kapitel 2.11.3) der *P. aeruginosa narL*-Mutante mit der Cosmid-Genbank von *P. aeruginosa* in *E. coli* wurde auf anaerobes Wachstum mit Nitrat in Anwesenheit von Tetracyclin (50  $\mu$ g/ml) und Chloramphenicol (10  $\mu$ g/ml) auf positive Klone selektioniert. Da die *narL*-Mutante zu keinem anaeroben Wachstum mit Nitrat befähigt ist, sollten nur die Klone wachsen, welche ein komplementierendes Cosmid aufgenommen haben. Da der Vektor eine Resistenzkassette für Tetracyclin enthält, wurde selbiges Antibiotikum dem Medium zugegeben. Da *P. aeruginosa* gegen höhere Antibiotika-Konzentrationen als *E. coli* resistent ist, wurden ebenfalls 10  $\mu$ g/ml Chloramphenicol zum Unterdrücken des *E. coli*-Wachstums dem Medium zugefügt. Das optimale Konzentrationsverhältnis beider Antibiotika wurde mittels Verdünnungsstufen bestimmt. Sowohl der Donorstamm, als auch der Rezipient der Zweipunktkreuzung, sowie der Wildtyp mit und ohne pLAFR3 ohne DNA-Insert wurden als Kontrollen immer mitgeführt.

Aus 9 positiven Klonen wurde die Cosmid-DNA isoliert. Dabei wurde auf gleiche Weise, wie bei der Plasmidpräparation vorgegangen (Kapitel 2.5.2). Um Cosmide in höherer Ausbeute und Reinheit isolieren zu können, wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den isolierten Cosmiden transformiert. Die Restriktionsanalyse der vorliegenden Cosmide zeigte 9 identische Schnittmuster, welche im Vergleich zum geschnittenen Leervektor zusätzliche Banden aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Das für die Komplementation der hergestellten Nitratreduktase-Mutanten benutzte Cosmid wurde mit pNQ07 bezeichnet.

## 2.12 Southern Blot

Bei der Herstellung von chromosomalen Knockout-Mutanten (siehe Kap. 2.13.3) wird das Zielgen, bzw. das Zieloperon entfernt und durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt. Der Nachweis, dass die Gentamycin-Resistenzkassette in die richtige Stelle im Genom von *P. aeruginosa* integriert wurde, erfolgte mittels Southern Blot Analyse (Southern, 1975), wobei mit einer DNA-Sonde die Gentamycin-Resistenzkassette nachgewiesen wurde.

### 2.12.1 Sondenherstellung

Zur Herstellung einer komplementären Gentamycin-Resistenzkassette-Sonde wurde das Gen *aaC1* aus dem Vektor pPS858 mittels PCR (siehe Kap. 2.8) amplifiziert. Der PCR-Reaktion wurden 2 µl des DIG-DNA-Labeling-Mix (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben, welcher das Digoxigenin(DIG)-markierte dUTP (DIG-dUTP) enthielt. Die Anlagerungstemperatur lag bei 57 °C, die Größe des PCR-Produktes betrug 615 bp. Die Reinigung erfolgte mittels Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aus einem 1%-igem Agarosegel, um eventuell die bei der Hybridisierung störenden Primer abzutrennen.

Verwendete Primer waren

Gm-SB-for: 5'-TCC AAG CAG CAA GCG CGT TA-3'

Gm-SB-rev: 5'-CCG ATC TCG GCT TGA ACG AA-3'.

Die Sonde wurde von Katharina Trunk angefertigt und zur Verfügung gestellt.

Der Test auf die Markierungseffizienz erfolgte durch den Vergleich mit markierter DNA der Firma Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Konzentration dieser Vergleichs-DNA betrug 100 ng/µl. Sowohl von der mittels PCR markierten als auch von der Vergleichs-DNA wurden 6 Verdünnungen von 1:100 bis 1:10<sup>6</sup> in 10er-Schritten hergestellt und je 1 µl auf einer positiv geladenen Nylonmembran (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgetragen, wobei die DNA reversibel durch ionische Kräfte an der Membran fixiert war. Um die DNA kovalent an die Nylonmembran zu binden, wurde die Membran mit 120 mJ UV-Licht bestrahlt (UV-Stratalinker®, 2400 von Stratagene, Heidelberg). Die Detektion der Sonde sowie der Vergleichs-DNA erfolgte wie im folgenden Kapitel beschrieben.

Aufgrund der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) wurde für die Hybridisierung 1 µg der Sonde verwendet.



### 2.12.2 DNA-DNA-Hybridisierung

Zum Nachweis des im Genom integrierten *aaC1*-Resistenzgens wurden 10 µg genomische DNA (Kapitel 2.5.1) mit je 30 Units der entsprechenden Restriktionsenzyme über Nacht verdaut und am nächsten Tag mittels Ethanol gefällt (siehe Kap. 2.6). Die Enzyme wurden so gewählt, dass drei unterschiedlich große Fragmente entstehen, welche die Gentamycinkasette enthalten. Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,8%-igem Agarosegel elektrophoretisch getrennt, 15 min durch Inkubation in 0,25 N HCl depurinisiert, in einer Lösung mit 0,5 N NaOH und 1,5 M NaCl 30 min denaturiert und anschließend für 30 min durch Inkubation in einer Lösung, welche 1 M Tris und 1,5 M NaCl enthält (pH 7,5), neutralisiert. Anschließend wurde die DNA mittels einer 20-fachen SSC-Lösung (pH 7,0), welche aus 300 mM Na<sub>3</sub>Citrat\*2H<sub>2</sub>O und 3 M NaCl besteht, in einer Vakuumblotanlage mit 50 mbar Unterdruck auf eine positiv geladene Nylonmembran (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) übertragen. Nach dem Transfer wurde die DNA durch Bestrahlung mit 120 mJ/cm<sup>2</sup> in einem UV-Crosslinker (UV-Stratalinker<sup>TM</sup> 2400, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

Die Hybridisierung und Detektion erfolgte in Hybridisierungsröhrchen (GM 45, Schott, Mainz) mit Hilfe eines Hybridisierungsofens (OV3, Firma Biometra, Göttingen). Zuerst wurde die Membran für 1 h bei 68 °C prähybridisiert (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 1 mM EDTA, 20 % (w/v) SDS, pH 7,2, 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz(s.u.)) und anschließend über Nacht bei 68 °C mit 1 µg DIG-markierter Sonde in 20 ml Prähybridisierungs-Lösung hybridisiert. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch dreimalige Inkubation für je 20 min bei 68 °C mit Waschpuffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, pH 7,2) entfernt. Die Stammlösung des Blocking-Reagenz besteht aus 10 % (w/v) Blocking-Reagenz (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in Maleinsäure-Lösung (100 mM Maleinsäure + 150 mM NaCl, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt).

Die Detektion erfolgte bei RT mittels Chemilumineszenz. Mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelte Anti-DIG-Antikörper binden an die DIG-markierte Sonde. Nach anschließender Zugabe des AP-Substrates CDP-Star, zerfällt dieses durch die enzymatische Dephosphorylierung, wobei Licht der Wellenlänge 477 nm freigesetzt wird, welches detektiert werden kann.

Hierfür wurde die Membran für 5 min mit Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 3 M NaCl, 0,3 % (v/v) Tween, pH 8,0) gewaschen und für 1 h mit 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz versetztem Maleinsäurepuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 1,5 µl Anti-DIG-Antikörper in Maleinsäurepuffer, versetzt mit 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz, für 30 min inkubiert. Der Blot wurde nun 4 x für je 10 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen und anschließend für 5 min mit Substratpuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 9,5) inkubiert. Die Membran wurde dann aus dem Hybridisierungsröhrchen

entnommen, auf eine Folie aufgelegt und mit 15 µl CDP-Star (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), verdünnt in 1,5 ml Substratpuffer, benetzt. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt. Nach einer Stunde Inkubation unter Lichtausschluss war das Reaktionsmaximum erreicht und die Chemilumineszenz wurde über einen Zeitraum von 10 bis 40 min detektiert. Die Größen der Banden wurden mit einem Digoxigenin-markiertem DNA-Längenstandard (DNA Molecular Weight Marker VII, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ermittelt.

## 2.13 Klonierungsstrategien

### 2.13.1 Konstruktion von *gfp*-Reporterfusionen des *nap*- und *nar*-Promotors

Zur Untersuchung der Expression der Gene des *nap*- und *nar*-Locus während der Biofilmbildung wurden die Sequenzen der dazugehörigen Promotoren an das Reportergen *gfp* für GFP („green fluorescent protein“) im pMH305-Vektor transkriptionell fusioniert. GFP ist ein kleines Protein, welches aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und kloniert wurde und durch die Anregung mit blauem Licht grün fluoresziert (Cubitt *et al.*, 1995). Für die Integration der Reporterfusion ins Genom von *P. aeruginosa* wurde die Sequenz der Fusion in den Vektor mini-CTX-2 kloniert. Dieser Vektor enthält eine *attP*-Stelle, mit der er in den chromosomalen *attB*-Locus (PA2603.1) von *P. aeruginosa* integrieren kann (Hoang *et al.*, 2000).

Die Messung der Intensität der Fluoreszenz von GFP in *P. aeruginosa*-Zellen, welche eine solche Reporterfusion enthalten, ist ein Maß für die Promotoraktivität.

Für die Herstellung der Reporterfusionen wurden die von Dr. M. Eschbach konstruierten Plasmide pMEP7 und pMEP9 eingesetzt. Bei pMEP7 handelt es sich um den miniCTX-*lacZ*-Vektor (Becher und Schweizer, 2000) mit dem *napE*-Promotor. Mit folgenden Primern amplifizierte Dr. M. Eschbach aus genomischer DNA von *P. aeruginosa* den stromaufwärts zum Translationsstart gelegenen Bereich (927 bp) von *napE* und klonierte anschließend das Fragment über die eingebrachten Schnittstellen in die MCS des *lacZ*-Reportervektors.

Folgende Primer wurden zur Amplifikation des *napE*-Promotorbereiches von Dr. M. Eschbach eingesetzt (Schnittstellen sind unterstrichen):

| Bezeichnung     | verwendete Primer                              | Schnittstelle |
|-----------------|--|---------------|
| Pa-napEprom-for | 5'-CG <u>GGATCC</u> -GGTCGGGTGTTTCGTTTCATTG-3' | <i>Bam</i> HI |
| Pa-orpH-rev     | 5'-GCGAATTC-AGGTTCTCCGGATGAGATGC-3'            | <i>Eco</i> RI |

Für die Herstellung des pMEP9 wurde von Dr. M. Eschbach aus dem Promotorbereich der Gene des *narK1K2GHIJ*-Locus das 400 bp große Insert, welches den stromaufwärts

von *narK1* gelegenen Bereich enthält, aus dem Vektor pQF-narK14 mit *SalI* und *HindIII* herausgeschnitten (Krieger, 2001). Anschließend wurde von ihm dieses Fragment mit dem Vektor mini-CTX-*lacZ* ligiert, nachdem dessen MCS mit *SalI* und *HindIII* geöffnet worden war.

Anhand der folgenden Primer, konnte die MCS, inklusive integriertem Fragment (Promotorbereich), des miniCTX-*lacZ*-Vektors amplifiziert werden. Beim leeren Vektor ergibt das eine Bande von 150 bp, beim Vektor pMEP7 eine Bande im Bereich von 1,1kb und bei pMEP9 eine Bande bei ca. 550 bp. Nach erfolgreich durchgeführter PCR konnten die DNA-Fragmente nach der Elektrophorese im Agarosegel nachgewiesen werden.

Primer zur Amplifikation der MCS des Vektors miniCTX-*lacZ* (abgeleitet von Dr. M. Eschbach):

| Bezeichnung | verwendete Primer          |
|-------------|----------------------------|
| CTX-MCS-for | 5'-TAACCGGAAGAAGGTCAATC-3' |
| CTX-MCS-rev | 5'-GCGCGTAATACGACTCACTA-3' |

Nach dem Schneiden der amplifizierten Promotorbereiche mit den entsprechenden Enzymen (*napE*: *Bam*HI und *Eco*RI; *narK*: *Bam*HI und *Kpn*I) erfolgte das Klonieren der Bereiche in den Vektor pMH305 und zwar direkt vor das *gfp*-Gen. Die erhaltenen Plasmide wurden mit pNQ03 und pNQ04 (Tab.3) bezeichnet. Zur Überprüfung erfolgt die Transformation dieser Plasmide in *E. coli* DH10 $\beta$ , wobei nach anschließender Minipräparation der Plasmid-DNA, die Größe des Vektors und des entsprechenden Inserts mittels Restriktionsanalyse kontrolliert wurde.

Anschließend wurden pNQ03 und pNQ04, ebenso wie der Leervektor pMH305 in PAO1 transformiert. Mit den daraus resultierenden Stämme PANQ07, PANQ08 und PANQ09 (Tab.2) wurden Wachstumstests durchgeführt, um die Fluoreszenz der *gfp*-Fusionen im Vergleich zum Leervektor zu bestimmen (s. Kap. 2.13.2). Führen die fusionierten Promotoren zu einer ausreichenden Fluoreszenz des Reporterproteinproduktes GFP, wurden sie zur Konstruktion von Integrationsvektoren eingesetzt.

Die Promotorbereiche mit dem fusionierten *gfp*-Gen wurden aus den Vektoren pNQ03 und pNQ04 mit dem Enzym *NotI* herausgeschnitten und in die MCS des mini-CTX2-Vektors kloniert. Erst nachdem die erhaltenen Plasmide pNQ05 und pNQ06 ebenfalls mittels Restriktionsanalyse kontrolliert wurden, erfolgte die Transformation von *E. coli* S17  $\lambda$ -pir mit beiden Plasmiden. Anschließend wurden die Konstrukte durch eine Zweipunktkreuzung in *P. aeruginosa* überführt (s. Kap. 2.11.3). In dem mini-CTX2-Vektor befindet sich eine *attP*-Stelle, mit der das Plasmid in den chromosomalen *attB*-

Locus (PA2603.1) von *P. aeruginosa* integrieren kann (Hoang *et al.*, 2000). Die Stämme wurden mit PANQ10 und PANQ11 (Tab.2) bezeichnet.

Der mini-CTX-2-Vektor ist so konstruiert, dass nach erfolgreicher Integration des Konstrukts in das Genom von PA01 die Antibiotika-Resistenzkassette und große Teile des Vektors wieder entfernt werden können. Die MCS des Vektors wird durch FRT-Erkennungssequenzen (FRT: Flp-Rekombinase target site) flankiert. An diesen bindet die Flp-Rekombinase, die auf dem Plasmid pFLP2 kodiert ist, und entfernt die dazwischen liegenden Teile des Vektors aus dem Genom (Hoang *et al.*, 1998). Das in *E. coli* SM10 vorliegende Plasmid pFLP2 wurde durch eine Zweipunktkreuzung in *P. aeruginosa* überführt. Die Ansätze wurden zur Selektion von *P. aeruginosa* mit dem Plasmid pFLP2 auf LB-Agar-Platten mit Carbenicillin und Chloramphenicol ausplattiert. Während der Expression des Plasmids in *P. aeruginosa* katalysiert die auf dem Plasmid kodierte Flp-Rekombinase das Entfernen des Vektorteilstücks zwischen den FRT-Erkennungssequenzen und hinterlässt dabei eine einzelne FRT-Sequenz von ca. 150 bp. Zur Selektion derjenigen *P. aeruginosa* Zellen, die das pFLP2-Plasmid nicht mehr enthalten, wurden die Zellen auf 5 % Saccharose (w/v) vereinzelt. Das Plasmid pFLP2 enthält das *sacB*-Gen. Das gebildete SacB Protein bildet ein für die Zelle toxisches Produkt, wenn Saccharose zum Medium gegeben wird. Dadurch können nur diejenigen Zellen wachsen, die das Plasmid verloren haben (Hoang *et al.*, 1998). Abschließend wurden die Klone zur Überprüfung, ob die Rekombinase die Tetracyclin-Resistenzkassette entfernt hat und das Plasmid pFLP2 eliminiert wurde, auf Sensitivität gegenüber den Antibiotika Tetracyclin und Carbenicillin getestet.

Die erhaltenen Stämme von PAO1 mit den integrierten *gfp*-Fusionen wurden mit PANQ12 (*napE<sub>P</sub>-gfp*) und PANQ13 (*narK<sub>P</sub>-gfp*) bezeichnet.

### 2.13.2 Bestimmung der Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP)

Zur Bestimmung der Fluoreszenz wurden in Minimalmedium gewachsene Kulturen eingesetzt, da dieses Medium eine geringe Eigenfluoreszenz aufweist. In bestimmten Zeitabständen wurde ein Aliquot entnommen und gegen unbewachsenes Medium als Nullwert im Fluoreszenzspektrometer (Typ LS50B der Firma Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA) vermessen. Die Excitations-Wellenlänge beträgt 475 nm und die Messung der Emission erfolgt bei 515 nm.

Da die Reifung bzw. Faltung von GFP sauerstoffabhängig ist, müssen anaerob wachsende Kulturen vor der Messung ihrer Fluoreszenz in Gegenwart von Sauerstoff inkubiert werden. Damit jedoch dieser Inkubationsschritt keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen und somit auf die Bildung von GFP hat, wurden 1 ml Kulturaliquot mit Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 300 µg/ml versetzt. Das Antibiotikum

Chloramphenicol verhindert weiteres Wachstum, indem es die Proteinbiosynthese hemmt und somit auch die Bildung von GFP in der Zelle. Während der folgenden 30-minütigen Inkubationszeit (aerob, bei RT) kommt es zur vollständigen Reifung und Faltung des schon gebildeten GFP, dessen Fluoreszenz dann gemessen werden kann.

### 2.13.3 Konstruktion von *P. aeruginosa* Knockout-Mutanten

Für die Herstellung der chromosomalen Knockout-Mutanten von *P. aeruginosa* wurde nach der Methode von Hoang *et al.* (1998) verfahren und der Suicide-Vektor pEX18Ap verwendet. Dabei wurden in die MCS dieses Vektors jeweils die flankierenden Bereiche (H1 und H2) des auszuschaltenden Genes und dazwischen die Gentamycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pPS858 kloniert (Abb.10a).

#### 1. Erstellen eines Knockout-Konstruktes

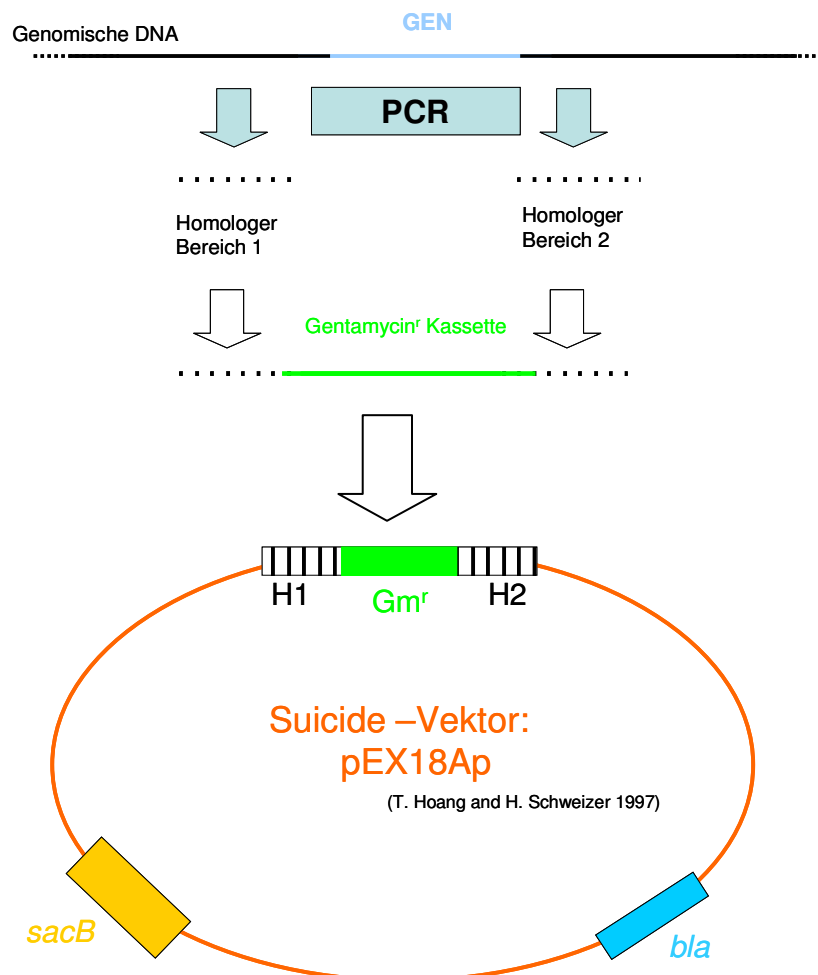


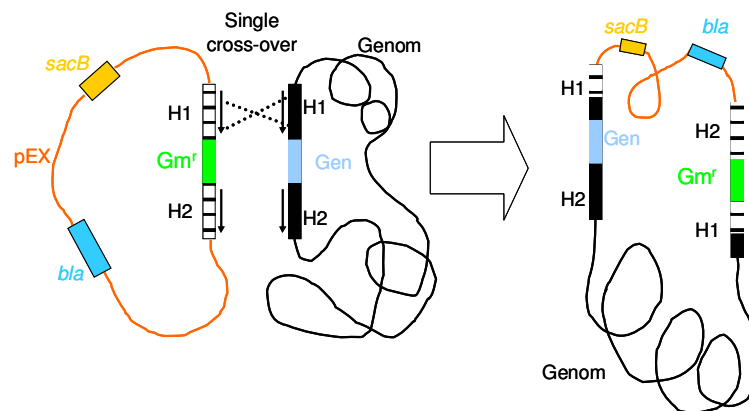
Abb.10a: Schematische Darstellung der Strategie zur Erstellung eines chromosomalen Knockout-Konstruktes in *P. aeruginosa*. Das *sacB*-Gen kodiert für eine Levansucrase und *bla* für die  $\beta$ -Lactamase.

Die konstruierten Vektoren wurden durch eine Zweipunktkreuzung vom *E. coli*-Stamm S17  $\lambda$  pir in den zu mutierenden *P. aeruginosa*-Stamm überführt (siehe Kap.2.11.3). Durch homologe Doppelrekombination mit eingebrachten Plasmid wird aus dem Chromosom das auszuschaltende Gen oder Operon deletiert und durch die Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt (Abb.10b).

Das Plasmid pEX18Ap enthält das *sacB*-Gen, welches für eine Levansucrase kodiert. Dieses Protein bildet in der Zelle ein toxisches Produkt, sofern 5 % Saccharose zum Medium zugegeben wird (Hoang *et al.*, 1998). Dadurch können nur diejenigen Zellen wachsen, welche nach der Rekombination die Plasmid-DNA und somit das *sacB*-Gen wieder verloren haben.

Da die verwendete Gentamycin-Kassette von zwei FRT-Seiten flankiert wird, kann anschließend mittels Flp-Rekombinase diese Kassette entfernt werden.

## 2. Integration des pEX-Vektors in das Genom von *P. aeruginosa*



## 3. Selektion auf Doppel Cross-Over: Zellen werden auf Saccharose und Gentamycin ausplattiert.

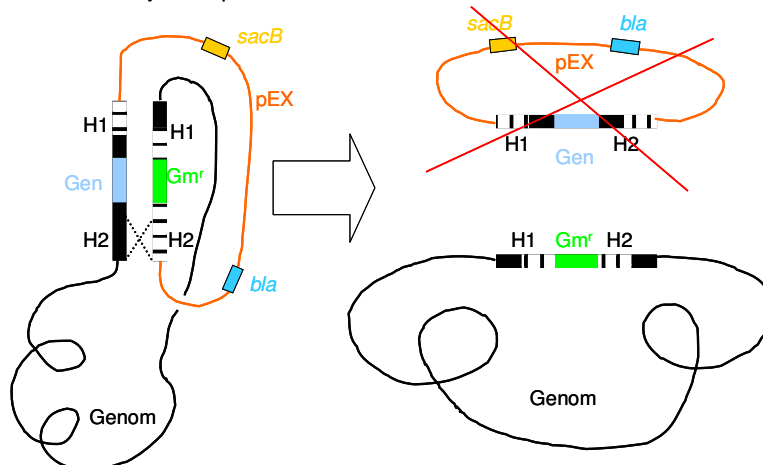


Abb.10b: Schematische Darstellung der homologen Doppelrekombination mit konstruierten Vektor für den chromosomalen Knockout.

### 2.13.3.1 Konstruktion der chromosomalen *nap*-Deletionsmutante PANQ02

Durch homologe Doppelrekombination mit dem Plasmid pNQ01 wurde aus dem Chromosom von *P. aeruginosa* das gesamte *nap*-Operon (*napCBADFE*) deletiert und durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt.

Für die Konstruktion des Suicide-Vektors pNQp01 wurden zuerst zwei PCR-Fragmente, welche eine 849 bp lange Sequenz (H1) stromabwärts des Gens *napC* sowie 650 bp (H2) stromaufwärts von *napE* enthalten, mit *PstI* und *BamHI* geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen verdauten pEX18Ap Vektor ligiert. Gleichzeitig enthielt dieser Ligationansatz die, durch das Schneiden von pPS858 mit *BamHI* und Reinigung aus einem Agarosegel gewonnene, Gm-Kassette. Das fertige Konstrukt pNQ01, bestehend aus dem Vektor pEX18Ap, der Gm-Kassette und diese Kassette flankierende homologen Bereiche (PCR-Produkte H1 und H2), wurde schließlich mittels Elektroporation in *E. coli* DH10beta transformiert (s. Kap. 2.11.1).

Nach der Präparation der Plasmid-DNA (s. Kap. 2.5.2) von 10 Klonen erfolgten Restriktionsanalysen mit unterschiedlichen Enzymen (*BamHI*; *PstI* und *Bgl II*; *PstI* und *BamHI*). Anhand der Schnittmuster konnten zwei erfolgreich klonierte Vektoren identifiziert werden, von denen einer durch Elektroporation in *E. coli* S17λ pir überführt wurde. Anschließend wurde der Suicide-Vektor durch eine Zweipunkt Kreuzung (s. Kap. 2.11.3) in *P. aeruginosa* gematet.

Der Suicide-Vektor pNQ01 ist in *P. aeruginosa* nicht frei replizierbar und so wachsen in Gegenwart von Gentamycin nur diejenigen Zellen, die die Resistenzkassette ins Chromosom integrieren konnten. Nach wiederholten Vereinzelungsausstrichen auf LB-Agarplatten mit 200 µg/ml Gentamycin und 5 % Saccharose wurden drei Kolonien selektioniert und weiter verwendet.

Um sicher zu gehen, dass der Vektors an richtiger Stelle im Genom integrierte, erfolgte hier ein Nachweis mittels Southern Blot (s. Kap. 2.12).

Konnte die korrekte Integration nachgewiesen werden, wurde die Gm-Kassette durch die Flp-Rekombinase entfernt (s. Kap. 2.13.1).

Auch dieser eingesetzte Vektor enthält das *sacB*-Gen, worauf hin wieder Saccharose für die Selektion eingesetzt werden kann.

Wächst der zu untersuchende Klon in Gegenwart von Saccharose, und ist sensitiv gegenüber Gentamycin und Carbenicillin, wurde davon ausgegangen werden, dass die Gm-Kassette aus dem Genom entfernt wurde und der Vektor pFLP2 ebenfalls nicht mehr in der Zelle vorhanden ist.

Die Primer NQP5.1 und NQP5.2, mit denen das PCR-Fragment H1 amplifiziert wurde, sowie die Primer NQP7.1 und NQP7.2, mit denen die Herstellung des PCR-Fragmentes H2 erfolgte sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab.5: Primer zur Amplifikation der homologen Bereiche für die Konstruktion des Suicide-Vektors pNQ01 (Schnittstellen sind unterstrichen)

| Bezeichg. | verwendete Primer                                 | Schnittstelle |
|-----------|---|---------------|
| NQP5.1    | 5'-AAC <u>TGC AGC</u> CGC CAG TCG TTC TTC CA-3'   | <i>PstI</i>   |
| NQP5.2    | 5'-CGC <u>GGA TCC</u> ACC ACC TGC CGG ACA TGA-3'  | <i>BamHI</i>  |
| NQP7.1    | 5'-CGC <u>GGA TCC</u> ATG CAG GCG ACT GTA GAA -3' | <i>BamHI</i>  |
| NQP7.2    | 5'-AAC <u>TGC AGG</u> CGC AGG TAA CGA TAG C -3'   | <i>PstI</i>   |

### 2.13.3.2 Konstruktion der chromosomalen *nar*-Deletionsmutante PANQ05

Die Herstellung dieser Mutante erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Konstruktion der chromosomalen *napCBADFE*-Mutante (s. 2.13.2.1). Durch homologe Doppelrekombination mit dem Plasmid pNQ02 wurden aus dem Chromosom von *P.aeruginosa* die vier Gene der respiratorischen Nitratreduktase (*narGHJI*) deletiert und durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt. Für die Herstellung des Suicide-Vektors pNQ02 wurden ebenfalls zwei PCR-Fragmente amplifiziert und mit *PstI* und *BamHI* geschnitten. Das Fragment H1 liegt stromabwärts von *narI* und ist 717 bp lang, das 716 bp große Fragment liegt stromaufwärts von *narG*. Zusammen mit der Gm-Kassette und dem pEX18Ap ergeben diese beiden homologen Bereiche den Suicide-Vektors pNQ02.

Die Primer NQP2.1 und NQP2.2, mit denen das PCR-Fragment H1 amplifiziert wurde, sowie die Primer NQP4.1 und NQP4.2, mit denen die Herstellung des PCR-Fragmentes H2 erfolgte sind in Tab.6 dargestellt.

Tab.6: Primer zur Amplifikation der homologen Bereiche für die Konstruktion des Suicide-Vektor pNQ02 (Schnittstellen sind unterstrichen)

| Bezeichg. | verwendete Primer                               | Schnittstelle |
|-----------|---|---------------|
| NQP2.1    | 5'-AAC <u>TGC AGA</u> CAT GCA GGC CAT AGC-3'    | <i>PstI</i>   |
| NQP2.2    | 5'-CGC <u>GGA TCC</u> AAC GTC CTG CCT GAA C-3'  | <i>BamHI</i>  |
| NQP4.1    | 5'-CGC <u>GGA TCC</u> TCG AGC AGG TGA CTC AT-3' | <i>BamHI</i>  |
| NQP4.2    | 5'-AAC <u>TGC AGC</u> ACC TTC GGC TCG TTC-3'    | <i>PstI</i>   |



### **2.13.3.3 Konstruktion der chromosomalen *nap-nar*-Doppelmutante PANQ06**

Der in Kapitel 2.13.2.2 beschriebene Suicide-Vektor pNQ02 wurde benutzt um aus dem Chromosom der in Kapitel 2.13.2.1 hergestellten *napCBADFE*-Mutante zusätzlich die Gene *narGHJI* zu entfernen. Die Doppelmutante wurde nach dem gleichen Prinzip wie die *narGHJI*-Mutante hergestellt (s. 2.13.2.2).

## **2.14 Proteom-Analyse: Zwei-dimensionale Gelelektrophorese mit immobilisierten pH Gradienten (IPG) und massenspektroskopischer Proteinidentifizierung**

O'Farrell veröffentlichte 1975 das Prinzip der zwei-dimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) zur Trennung von Proteinen nach den beiden physikalischen Größen Ladung und molekulare Masse. Dadurch wird die Untersuchung von mehreren hundert Proteinen auf einem Gel ermöglicht. Prof. Görg und Mitarbeiter verbesserten das Auflösungsvermögen und die Reproduzierbarkeit der 2-D Technik durch Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten (IPG) bei der isoelektrischen Fokussierung (Görg *et al.*, 1985).

### **2.14.1 Zellernte**

*P. aeruginosa* wurde wie unter 2.3.5 beschrieben im entsprechenden Medium kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde zum Zielzeitpunkt möglichst schnell zum Stillstand gebracht, indem das aus dem Kulturgefäß entnommene Medium sofort mit dem gleichen Volumen an eisgekühltem Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7,4) versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Alle nachfolgenden Schritte wurden zügig bei 4 °C durchgeführt, um Veränderungen der Proteinzusammensetzung während der Präparation zu vermeiden. Die gekühlten Zellen wurden bei 8000 g und 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert, die Zellsedimente mit 50 ml Kalium-Phosphat-Puffer zwei mal gewaschen und nach letztem Zentrifugationsschritt in 3 - 5 ml Kalium-Phosphat-Puffer resuspendiert. Diese Waschschrte dienten der Entfernung störender extrazellulärer Substanzen wie beispielsweise Salze und metabolische Endprodukte. Die Zellsuspensionen wurden in Portionen zu 1 ml bei -80 °C gelagert. Von diesen wurden je 60 µl für die spätere BCA-Proteinbestimmung (2.8.3.1) entnommen und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

### **2.14.2 Phenolextraktion und Acetatfällung der Proteine**

Um Proteinproduktionsprofile analysieren zu können, müssen Proteinextrakte des jeweiligen Stammes hergestellt werden. Zytoplasmatische Proteine lassen sich in der 2D-PAGE in der Regel gut unter Verwendung herkömmlicher Gesamtzellextrakte gut

darstellen. Die Herstellung der Gesamtzellextrakte hatte zum Ziel, einen möglichst großen Anteil der intrazellulär und membranassoziiert vorliegenden Proteine in einem mit der zweidimensionalen Elektrophorese kompatiblen Puffersystem in hinreichend hoher Proteinkonzentration in Lösung zu bringen und hierbei nach Möglichkeit störende Substanzen, wie beispielsweise Nukleinsäuren und Lipide zu entfernen.

Die Zellen wurden durch Zugabe von Phenol (pH 7,4) und anschließendem Erhitzen auf 70 °C aufgeschlossen. Dabei wurden jeweils die wässrigen Phasen verworfen, um Salze, Nukleinsäuren, Polysaccharide und andere hydrophile Zellbestandteile zu entfernen. Bei dieser Methode lösen sich einige hydrophobe Proteine in der organischen Phenol-Phase, während sich die anderen nach der Zentrifugation denaturiert in der Interphase ansammeln (Hanna *et al.*, 2000, Hancock und Nikaido, 1978). Abschließend werden die Proteine mit Aceton gefällt und der Proteinextrakt getrocknet.

Eine nach der oben beschriebenen Methode (s. Kap. 2.14.1) hergestellte, bei -80 °C gelagerte Zellsuspension (940 µl) wurde mit 1 ml Kalium-Phosphat-Puffer und 2 ml Phenol (pH 7,4) versetzt und für 2 min stark geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 10-minütige Inkubation bei 70 °C im Wasserbad. Danach wurden die Zellen weitere 10 min bei 0 °C auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C für 20 min. Nachdem die obere wässrige Phase verworfen worden ist, wurden 2 ml destilliertes Wasser zum Waschen hinzugegeben und die vorherigen Schritte 2 x wiederholt (starkes Schütteln, 10 Minuten bei 70 °C, 10 min bei 0 °C, Zentrifugation, Verwerfen der wässrigen Phase). Danach wurden die Proteine durch Zugabe von 4 ml kaltem Aceton und 10-minütiger Inkubation auf Eis vollständig gefällt. Nach der Zentrifugation (4000 g; 15 min; 4 °C) wurde der Überstand (Phenol/Aceton-Gemisch) verworfen und der Proteinextrakt mit weiteren 6 ml Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und der an Luft getrocknete Proteinextrakt bei -80 °C gelagert.

### **2.14.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **2.14.3.1 BCA-Test**

Um die Proteinkonzentration einer Bakteriensuspension mit Hilfe des BCA-Tests zu bestimmen, wurden die Zellen vorerst alkalisch aufgeschlossen. Dabei wurden 60 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl destilliertem Wasser verdünnt und danach mit 150 µl 2 N Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Die Suspension wurde 1 Stunde bei 70 °C im Thermomixer inkubiert. Von diesem Zelllysate wurden 50 µl für den BCA-Test eingesetzt. Die Lösungen des BCA-Tests wurden kurz vor Gebrauch so angesetzt, wie in der Anleitung des Herstellers Sigma (Deisenhofen) beschrieben. 50 µl der Probe wurden mit

1 ml Nachweislösung versetzt und 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlung des Gemischs auf Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte durch Vergleich mit einer Eichgeraden, bei der BSA als Standard eingesetzt wurde, ermittelt werden.

### **2.14.3.2 Proteinbestimmung mit dem Plus One 2D Quant Kit**

Nach Zugabe von Detergenzien und Reduktionsmitteln wurde für die Proteinbestimmung der PlusOne 2D Quant Kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) benutzt. Dazu wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

### **2.14.3.3 Bradford-Test**

Für die Etablierung eines geeigneten Verfahrens, die Konzentration des nach der Fällung gelösten Proteins zu bestimmen, wurde der Bradford-Test durchgeführt. Zu 100 µl Proteinprobe im entsprechenden Puffer wurden 900 µl Bradford-Reagenz (Roti-Quant, 1:5 verdünnt) der Firma Roth (Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe) zugegeben. Nach 5 min Inkubation wurden die Proben bei 595 nm vermessen.

### **2.14.3.4 Absorptionsmessung**

Um die Konzentration des nach der Fällung gelösten Proteins zu bestimmen wurden ebenfalls Absorptionsmessungen durchgeführt. Nachdem die Proteine im Puffer gelöst vorlagen, erfolgte die Aufnahme eines UV-Spektrums von 200 bis 300 nm. Als Blindwert wurde Puffer ohne Protein verwendet.

### **2.14.4 Rehydratisierung der Proteine**

Bevor der getrocknete Proteinextrakt für die Isoelektrische Fokussierung eingesetzt werden konnte, musste dieser rehydratisiert werden. Da die Proteine nach ihrer elektrischen Ladung getrennt werden sollen, können zur Solubilisierung keine ionischen Tenside (wie z.B. SDS) verwendet werden. Die Rehydratisierungslösung enthält deshalb folgende Komponenten, um die Proteine dennoch möglichst vollständig zu lösen und zu denaturieren:

Das zwitterionische Detergenz 3-[(3Cholamidopropyl)-dimethyl-amino]-Propansulfat (CHAPS) verhindert hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Bereichen der Proteine. Die Nettoladung der Proteine wird dabei im Gegensatz zur Verwendung von SDS nicht verändert.

Triton X-100TM ist ein ungeladenes Detergenz und besitzt eine ähnliche Funktion wie CHAPS.

Dithiothreitol (DTT) reduziert die kovalenten Disulfid-Brücken der Proteine zu Thiolgruppen.

Darüber hinaus entziehen Harnstoff und Thioharnstoff den Proteinen die Hydrathülle. Hierdurch werden die Proteine denaturiert.

|                            |               |           |
|----------------------------|---------------|-----------|
| Rehydratisierungslösung-a: | Harnstoff     | 7 M       |
|                            | Thioharnstoff | 2 M       |
|                            | CHAPS         | 4 % (w/v) |
|                            | DTT           | 50 mM     |

Der Puffer wurde entweder direkt verwendet oder aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Erwärmung des Puffers über  $25^{\circ}\text{C}$  wurde vermieden. Durch verstärkte Zersetzung des Harnstoffs unter diesen Bedingungen können während der isoelektrischen Fokussierung durch Carbamoylierung von Aminosäureresten Artefakte entstehen.

Die getrockneten Proteinextrakte wurden in Rehydratisierungslösung-a vollständig resuspendiert. Dabei wurden die verschiedenen Proteinkonzentrationen der Proben durch Zugabe unterschiedlicher Volumina an Rehydratisierungslösung-a ausgeglichen. Eine geeignete Probenmenge (500 - 700  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein) wurde dann entnommen und in Rehydratisierungspuffer-a auf ein Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  verdünnt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Rehydratisierungslösung-b. Diese enthält zusätzlich dem entsprechenden pH-Gradienten angepassten Trägerampholyte (Stabilisierung des pH-Gradienten) und zur späteren Kontrolle der Trennung während der IEF den Farbstoff Bromphenolblau.

|                            |                           |                   |
|----------------------------|---------------------------|-------------------|
| Rehydratisierungslösung-b: | Rehydratisierungslösung-a | 2.5 ml            |
|                            | Ampholytlösung            | 125 $\mu\text{l}$ |
|                            | TritonX-100               | 125 $\mu\text{l}$ |
|                            | Bromphenolblau            | Spatelspitze      |

### 2.14.5 Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten (IPG)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) von Proteinen macht sich die Ladungseigenschaften der Proteine zunutze. Der Ladungszustand von Polypeptiden ist vom jeweiligen Verhältnis geladener Aminosäuren und vom pH-Wert abhängig, somit individuell charakteristisch. Bei der IEF werden deshalb pH-Gradienten in der Trennmatrix (Polyacrylamid) erzeugt, die so gestaltet sind, dass die Proteine einer zu trennenden Mischung an eine Stelle der Matrix gelangen, an der der pH-Wert ihrem

isoelektrischen Punkt entspricht. Am isoelektrischen Punkt (pI) jedoch, welcher für jedes Protein charakteristisch ist, beträgt die Nettoladung Null, so dass die Migration des Proteins im elektrischen Feld an diesem Punkt endet, es also auf den isoelektrischen Punkt fokussiert wird. Die pH-Gradienten werden durch die sogenannten Ampholyte erzeugt. Ampholyte sind Moleküle mit mehreren positiven und negativen Ladungen.

Für die IEF wurden Polyacrylamidgele mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) der Firmen Bio Rad (Hercules, Kalifornien, USA) und Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) verwendet. Die gebrauchsfertigen Gel-Streifen werden unter der Bezeichnung „Ready Strip“ (Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA) und „Immobiline DryStrip“ (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) mit verschiedenen pH-Gradienten angeboten.

Die getrockneten IPG-Streifen des jeweiligen pH-Bereiches wurden vor der eigentlichen Fokussierung direkt mit der Proteinprobe rehydratisiert. Dazu wurden der Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten vorsichtig in den mit Proteinproben beladenen Rehydratisierungs-Tray (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) hineingelegt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde wurden die IPG-Streifen, um sie vor Austrocknung bzw. der Auskristallisierung des Harnstoffs zu schützen, mit Mineralöl überschichtet und für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Rehydratisierung der IEF-Streifen in der Proteinlösung erfolgte die Fokussierung im IEF-Tray (PROTEAN IEF-Cell, Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA). Dazu wurden die IEF-Streifen aus dem Rehydratisierungs-Tray herausgenommen und das überschüssige Mineralöl vorsichtig entfernt. Die Elektrodendrähte der Fokussierungskammern wurden mit Wasser getränkten Filtern abgedeckt. Anschließend wurden die IEF-Streifen mit der Gelseite nach unten in den IEF-Tray gelegt. Es wurde das in Tabelle 7 beschriebene Zeitprogramm für die anliegende Spannung verwendet, wobei die Stromstärke auf 50  $\mu$ A/ Streifen begrenzt wurde. Nach mindestens 110 kWh war die isoelektrische Fokussierung beendet und die Gelstreifen wurden bis zur 2. Dimension in Klarsichthüllen bei -80 °C eingefroren oder gleich für die 2. Dimension vorbereitet.

Tab.7: IEF-Spannungs-Programm

| Schritt | Dauer    | Spannung |
|---------|----------|----------|
| 1       | 1 h      | 250 V    |
| 2       | 1 h      | 500 V    |
| 3       | 1 h      | 1000 V   |
| 4       | 22 h     | 5000 V   |
| 5       | $\infty$ | 500 V    |

#### 2.14.6 SDS-PAGE als zweite Dimension der 2D-Elektrophorese

In der zweiten Dimension der 2D-Elektrophorese werden die Proteine, gegenüber der Laufrichtung der IEF um 90° gedreht, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurde die Methode der Glycin-SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate – Polyacrylamide gelelectrophoresis) nach Laemmli (1970) angewandt. Eingesetzt wurde zu diesem Zweck das vertikale Ettan DALT *twelve* System (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden), welches aufgrund seiner Abmessungen (Gelgröße: 26 x 20 cm) eine relativ große Auftrennungsfläche bietet.

Da erste und zweite Dimension der 2D-Elektrophorese in äußerst unterschiedlichen Puffersystemen durchgeführt werden, ist es notwendig, die IPG-Streifen vor der Durchführung der zweiten Dimension auf das Puffersystem der Tris-Glycin-SDS-PAGE einzustellen. Besonders die Beladung der Proteine mit SDS im Anschluß an die IEF ist Voraussetzung für einen effizienten Transfer der Proteine in das 2D-Gel. Erreicht wird dies durch die Inkubation der IPG-Streifen in einem Äquilibrationpuffer, welcher neben den Komponenten des SDS-PAGE-Puffersystems noch Glycerin enthält. Weiterhin wird mit der Äquilibration eine erneute Reduzierung von Cysteinresten in den aufgetrennten Proteinen durch Behandlung mit DTT verbunden um einen denaturierten Zustand der Proteine zu gewährleisten. In einem zweiten Schritt wird dann Iodacetamid eingesetzt, um die reduzierten Cysteinreste zu schützen und die erneute Ausbildung von Disulfidbrücken somit dauerhaft zu verhindern. Iodacetamid besitzt weiterhin die Eigenschaft, überschüssiges DTT des vorangegangenen Schrittes abzufangen und somit durch DTT hervorgerufene Artefakte (horizontale artifizielle Linien sowie vertikales Schmieren der Spots) zu verhindern (Görg *et al.*, 1987).

Die Durchführung der Äquilibration erfolgt durch 15 minütiges Schwenken der IPG-Streifen in Äquilibrationlösung 1 und anschließende Überführung der Streifen in Äquilibrationlösung 2, in welcher die Streifen ebenfalls 15 Minuten geschwenkt werden.

|                        |                   |              |
|------------------------|-------------------|--------------|
| Äquilibrationlösung 1: | Tris-HCl (pH 8,8) | 50 mM        |
|                        | Harnstoff         | 6 M          |
|                        | SDS               | 2 % (w/v)    |
|                        | Glycerin          | 35 % (w/v)   |
|                        | Bromphenolblau    | Spatelspitze |
|                        | DTT               | 15 mM        |

Äquilibrationlösung 2: wie Lösung 1 nur anstelle von DTT, 150 mM Iodacetamid

Für die Auftrennung der untersuchten bakteriellen Proteingemische erwiesen sich 2D-Gele mit einem Polyacrylamidgehalt von 10 oder 12 % als gut geeignet. Das homogen

vernetztes SDS-Gel wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) ohne Sammelgel hergestellt. Die bei 4 °C hergestellten Lösungen für 10 %ige oder 12 %ige Polyacrylamid-Gele (siehe unten) wurden kurz durchmischt. Direkt vor dem Gießvorgang werden die Katalysatoren APS und TEMED dazugegeben. Der Polymerisationsvorgang dauerte ungefähr 2 Stunden. Die Gele wurden bis zum Gebrauch in feuchter Atmosphäre bei 4 °C zwischen den Glasplatten gelagert.

|   |                           |            |
|---|---------------------------|------------|
| Acrylamid-Stammlösung:                  | Acrylamid                 | 29 % (w/v) |
|   | N,N'-Methylenbisacrylamid | 1 % (w/v)  |
| Polyacrylamid-Gele (10 %):<br>(14 Gele) | Acrylamid-Stammlösung     | 400 ml     |
|   | 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)   | 300 ml     |
|   | MilliQ-H <sub>2</sub> O   | 480 ml     |
|   | SDS (10%, w/v)            | 10 ml      |
|   | APS (10 %, w/v)           | 3 ml       |
|   | TEMED                     | 1 ml       |
| Polyacrylamid-Gele (12 %):<br>(14 Gele) | Acrylamid-Stammlösung     | 417 ml     |
|   | 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)   | 250 ml     |
|   | MilliQ-H <sub>2</sub> O   | 318 ml     |
|   | SDS (10%, w/v)            | 10 ml      |
|   | APS (10 %, w/v)           | 5 ml       |
|   | TEMED                     | 1 ml       |

Nach Entfernung überschüssiger Iodacetamidlösung vom IPG-Streifen wurde dieser unter Vermeidung von Lufteinschlüssen auf die Acrylamidgele der zweiten Dimension gelegt.

Um bereits im Bereich der Streifen ein möglichst homogenes Feld zu erzielen und stärkere Diffusion der Proteine durch deren Übertritt in die flüssige Pufferphase zu verhindern wurde 2% (w/v) Agarose in SDS-Laufpuffer (siehe unten) durch Aufkochen gelöst und bis zum oberen Rand der Glasplatten auf die Streifen gegossen. Zuvor die Agarose-Lösung mit etwas Bromphenolblau angefärbt, um während der elektrophoretischen Auftrennung die Migration verfolgen zu können.

Die anschließende Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei Raumtemperatur über Nacht (1 - 2 W pro Gel). Erreichte die Bromphenollauffront am nächsten Tag die Unterseite der Gele, wurde die Elektrophorese beendet.

|                           |        |             |
|---------------------------|--------|-------------|
| SDS-Elektrophoresepuffer: | Glycin | 380 mM      |
|                           | Tris   | 50 mM       |
|                           | SDS    | 0,1 % (w/v) |

|                 |                          |              |
|-----------------|--------------------------|--------------|
| Agarose-Lösung: | SDS-Elektrophoresepuffer | 25 ml        |
|                 | Agarose                  | 2 % (w/v)    |
|                 | Bromphenolblau           | Spatelspitze |

### 2.14.7 Fixierung und Färbung der Gele

#### 2.14.7.1 Färbung mit kolloidalem Coomassie

Die Gele wurden mit 30 % Ethanol und 2 % Phosphorsäure ca. 2 Stunden fixiert. Danach wurden die Gele drei mal 20 Minuten mit 2 % Phosphorsäure gewaschen und 30 Minuten in Äquibrierlösung (s. unten) geschwenkt. Durch anschließende Zugabe von 2.5 ml Brilliant Blue Stammlösung (2 % w/v) in 250 ml Äquibrierlösung wurden die Gele gefärbt. Vor dem Scannen wurde der Coomassie-Farbstoff wieder vollständig mit deionisiertem Wasser aus dem Gelhintergrund ausgewaschen. Dazu musste in einem Zeitraum von 24 - 72 Stunden das Wasser mehrmals gewechselt werden.

|                  |                |         |
|------------------|----------------|---------|
| Äquibrierlösung: | Ethanol        | 18% v/v |
|                  | Phosphorsäure  | 2% v/v  |
|                  | Ammoniumsulfat | 15% w/v |

#### 2.14.7.2 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet das Ag<sup>+</sup>-Ion Komplexe mit den Glu-, Asp-, und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag<sup>+</sup> der Komplexe zu Ag. Der Vorteil dieser Färbung liegt in der hohen Empfindlichkeit. Folgendes Protokoll (Rabilloud und Charmont, 1999) kam zur Anwendung:

Die Gele wurden 1,5 Stunden in 5 % Essigsäure und 30 % Ethanol fixiert, wobei die Fixierlösung alle 30 min erneuert wurde. Um die Färbung der Proteine sensitiver zu machen, wurden die Gele über Nacht in der S-Lösung (s. unten) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten 6 Waschrunde mit MilliQ-Wasser, jeder Schritt dauerte 20 min. Die Gele wurden dann für 1,5 Stunden mit der I-Lösung imprägniert und anschließend noch mal ganz kurz (5 - 10 s) gewaschen. Nach Zugabe des Entwicklers (D-Lösung) wurden die Gele permanent beobachtet um die Reaktion rechtzeitig mit der S-Lösung abstoppen zu können. Schon nach 2 min waren die Proteine deutlich gefärbt, ebenso der Hintergrund.



Der Entfernung der S-Lösung nach 45 min folgen mehrere Waschrunde mit MilliQ-Wasser. Abschließend können die Gele mittels FX-Scanner (Molecular Imager FX der Firma Bio Rad, Hercules, Massachusetts, USA) digitalisiert werden.

|           |                         |           |
|-----------|-------------------------|-----------|
| S-Lösung: | Kaliumtetrathionat      | 3 g/l     |
|           | Kaliumacetat            | 49,08 g/l |
|           | Ethanol                 | 25 %      |
|           | Glutaraldehyd           | 5 g/l     |
| I-Lösung: | Silbernitrat            | 2,04 g/l  |
|           | Formalin (37%)          | 500 µl/l  |
| D-Lösung: | Kaliumcarbonat          | 30 g/l    |
|           | Formalin (37%)          | 250 µl/l  |
|           | Natriumthiosulfat (10%) | 125 µl/l  |
| S-Lösung: | Tris                    | 40 g/l    |
|           | Essigsäure              | 2 %       |

Für alle Lösungen wurde MilliQ-Wasser verwendet.

### 2.14.7.3 Fluoreszenzfärbung

Die Fluoreszenzfärbung weist im Vergleich zur beschriebenen Coomassie-Färbung den Vorteil höherer Sensitivität einerseits und bessere Quantifizierbarkeit der in den Proteinflecken enthaltenen Proteinmenge andererseits auf (Steinberg *et al.*, 2000). Die Proteine wurden mit Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (RuBPS) angefärbt. Die detektierbare Sensitivität dieses Fluoreszenz-Farbstoffes liegt bei etwa 5 - 10 ng Protein und ist somit höher als eine Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue. RuBPS erreicht zwar nicht ganz die Empfindlichkeit einer Färbung mit Silbernitrat, aber Fluoreszenzfärbungen sind über einen viel größeren Bereich linear (ungefähr vier Zehnerpotenzen). Die nicht-kovalent an die Proteine gebundenen Ruthenium-Chelate können sowohl unter UV-Strahlung (Absorptionsmaximum bei 280 nm) als auch mit sichtbarem Licht (Absorptionsmaximum bei 450 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Färbemethode ist, dass eine nachfolgende massenspektroskopische Untersuchung (MALDI) der Proteine nicht beeinträchtigt wird (Rabilloud *et al.*, 2001). Das Färbeprotokoll wurde von Rabilloud *et al.* (2001) mit leichten Modifikationen übernommen: Zuerst wurden die Proteine bis zu 16 Stunden im Gel fixiert, wobei die Fixierlösung (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) nach den ersten 2 Stunden einmal ausgetauscht wurde. Zur Färbung mit RuBPS wurden die Gele anschließend für mindestens 6 Stunden in RuBPS-Färbelösung inkubiert. Vor dem Scannen im FX-

Scanner (Molecular Imager FX der Firma Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA) wurden die Gele 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

|               |            |            |
|---------------|------------|------------|
| Fixierlösung: | Ethanol    | 30 % (v/v) |
|               | Essigsäure | 10 % (v/v) |

|                    |                  |             |
|--------------------|------------------|-------------|
| RuBPS-Färbelösung: | Ruthenium-Chelat | 0,8 $\mu$ M |
|                    | Ethanol          | 30 % (v/v)  |
|                    | Essigsäure       | 10 % (v/v)  |

Der zur Proteinfärbung eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff RuBPS wurde nach der Vorschrift von Rabilloud *et al.* (2001) mit leichten Modifikationen von Dr. M. Eschbach synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

### 2.14.8 Dokumentation und Auswertung der Gele

Zur dauerhaften Dokumentation und Auswertung der Proteinmuster wurden digitalisierte Aufnahmen der gefärbten Gele erstellt. Hierzu wurde für die RuBPS-gefärbten Gele der Fluoreszenzscanner Molecular Imager FX (Firma Bio Rad, Hercules, Massachusetts, USA) verwendet. Gescannt wurde mit einer Auflösung von 0.1 mm unter Anregung von 532 nm durch den Laser. Die Bilder wurden im Tiff-Format abgespeichert. Das Scannen der Coomassie gefärbten Gele erfolgte mit einem Flachbettscanner mit einer Auflösung von 300 dpi oder ebenfalls mit dem Molecular Imager FX.

Die hergestellten Proteingele waren hinsichtlich auftretender Veränderungen im Proteinmuster, und hierbei insbesondere im Vergleich unterschiedlicher Zustände, zu analysieren. Die einfachste und schnellste Möglichkeit des Vergleichs bestand in der einfachen Betrachtung der gefärbten Originalgele (Coomassie) bzw. der aufgenommen digitalisierten Bilder am Bildschirm (RuBPS). Hierbei konnten Proteine abweichender Quantität relativ leicht erkannt werden.

Zur detaillierten Auswertung wurde auf das zur Verfügung stehende Computerprogramm Z3 (Version 3.0, Compugen, Tel Aviv, Israel) zurückgegriffen. Die Auswertung, die entsprechend des Handbuchs der Software durchgeführt wurde, läuft in drei nacheinander folgenden Schritten ab. Zunächst werden die gefärbten Proteine detektiert. Danach werden alle Proteine den Proteinen der Vergleichsgele zugeordnet (das so genannte „*matchen*“). Zuletzt wurden die Proteinverteilung hinsichtlich auftretender und nicht auftretender Proteine und deren Quantität verglichen.

### 2.14.9 Identifizierung von Proteinen

Die Identität der Proteine aus den 2-D Gelen wurde im Massenspektrometer durch MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight*) Analysen bestimmt. Bei dieser Methode wird das aus der Gelmatrix ausgeschnittene Protein zuerst proteolytisch gespalten. Dazu werden Proteasen verwendet, welche Proteine nach bekanntem Muster zerschneiden. Die molekularen Massen der proteolytischen Spaltprodukte werden danach mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt. Es entsteht ein für jedes Protein einmaliges Fragmentmuster. Da das komplette Genom und damit auch das Proteom von *P. aeruginosa* bekannt sind, kann das Fragmentmuster für jedes Protein *in silico* vorhergesagt werden. Wenn die MALDI-Analyse genügend Signale liefert, lässt sich durch den Vergleich der gemessenen Größenverteilung der Proteinfragmente mit dem vorhergesagten Spektrum fast jedes Protein identifizieren.

Bei der MALDI-Analyse wird die Probe für wenige Nanosekunden mit kurzweiligem Laserlicht bestrahlt. Die elektronische Anregungsenergie führt zu einer lokalen Auflösung der Festkörperoberfläche (Matrix und Probe). Die Moleküle treten in die Gasphase über. Eine Elektrode, die sich in geringem Abstand gegenüber der Probe befindet, erzeugt ein elektrostatisches Feld, das je nach Polarität der Elektrode positive oder negative Ionen von der Probenoberfläche in Richtung des Analysators beschleunigt. Für MALDI-Untersuchungen werden Flugzeitmassenspektrometer (TOF, *time of flight*) als Analysatoren benutzt. Die Massenbestimmung erfolgt über die genaue Messung der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Probe bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Werten werden bei gleicher kinetischer Energie in der Beschleunigungsstrecke auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht. Bei bekannter Beschleunigungsspannung und Flugstrecke der Ionen in der feldfreien Driftstrecke lässt sich durch Messung der Flugzeit der Ionen das  $m/z$ -Verhältnis bestimmen. Die Kalibrierung erfolgt über Referenzsubstanzen mit bekannten Massen.

#### 2.14.9.1 Tryptischer Verdau und Peptidextraktion

Bei der Durchführung aller folgenden Schritte wurde stets mit in Wasser gewaschenen Handschuhen gearbeitet, um eine Kontamination der Proben durch Keratin (z.B. aus Hautschuppen) oder PEG („Weichmacher“ der Handschuhe) zu vermeiden.

Nachdem die Proteine aus dem Gel entfernt worden waren, wurden sie mittels eines Skalpells kleingehackt, in Eppendorfgefäße überführt und mit 200  $\mu$ l destilliertem Wasser für 5 Minuten gewaschen. Die Gelstückchen wurden dann mit dem 3 – 4 fachen Volumen an Acetonitril versetzt und für 10 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gelfragmente in der SpeedVac getrocknet. Zur spezifischen Spaltung der Proteine in definierte Peptide wurde Trypsin der Firma Promega (Wisconsin, USA) verwendet. Die

getrockneten Gelstückchen überschichtete man anschließend mit 10 µl Trypsinlösung (2 µg/ml Trypsin in 50 mM Ammoniumbicarbonat) und inkubierte sie für mindestens 12 Stunden bei 37 °C. Zur Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix wurde folgendermaßen verfahren: Nach der Zugabe von 15 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, wurden die Proben für 15 Minuten bei 37 °C schüttelnd im Thermomixer inkubiert. Danach wurden 50 µl Acetonitril hinzugefügt und das Gemisch für weitere 15 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Überstände mit den darin enthaltenen Peptiden wurden abgenommen und in Eppendorfgefäßen gesammelt. Um weitere Peptide zu extrahieren, wurden 50 µl 5 % Ameisensäure zu den Gelstückchen gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Die Gelfragmente wurden dann erneut durch Zugabe von 50 µl Acetonitril und 15-minütiger Inkubation (schüttelnd; 37 °C) dehydratisiert. Die Überstände wurden zu den gesammelten Überständen gegeben und in der SpeedVac auf ca. 10 µl konzentriert.

### 2.14.9.2 Aufreinigung der Peptide

Die gewonnenen Peptidlösungen wurden mit ZipTips µC18 der Firma Millipore GmbH (Eschborn) entsalzt und aufkonzentriert. Hierbei handelt es sich um Pipettenspitzen mit eingebrachtem „*reversed phase*“ C-18 Chromatografiematerial geringen Volumens, an welches Peptide gebunden, gewaschen und anschließend in einem sehr kleinen Volumen wieder eluiert werden können.

Die ZipTips wurden zunächst durch mehrmaliges Pipettieren einer Lösung von 0.5% Ameisensäure und 65% Methanol gewaschen und anschließend durch Pipettieren von 0.5% Ameisensäure und 5% Methanol äquilibriert. Danach erfolgte das Binden der Peptide am Trägermaterial durch zehnmaliges langsames Pipettieren der Probe, gefolgt von der Reinigung der Peptide durch fünfmaliges Pipettieren von je 10 µl frischer Waschlösung (0.5% Ameisensäure und 5% Methanol). Anschließend wurden die gereinigten Peptide durch mehrmaliges Pipettieren von 5 µl Elutionslösung (0.5% Ameisensäure und 65% Methanol) in ein Mikroliterreaktionsgefäß eluiert. Zur Vorbereitung der MS-Analyse wurden danach 0.5 µl Eluat mit 0.5 µl matrixgesättigter Elutionslösung ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 0.5% Ameisensäure und 65% Methanol) gemischt und auf einen Probenpunkt des MS-Targets platziert.

Alle weiteren Arbeitsschritte der MALDI-Analyse wurden im Labor von Dr. Lothar Jänsch an der GBF durchgeführt.

### 2.15 Biofilmuntersuchungen

Die Biofilmuntersuchungen wurden in Lyngby an der DTU (Technische Universität Dänemark) im Biozentrum bei den Arbeitsgruppen von Prof. S. Molin und Prof. M.

Givskov durchgeführt. Zur Anwendung kam das in den Arbeitsgruppen etablierte „Flow chamber system“ und ein Mikrotiterplatten-Assay.

### 2.15.1 Das Durchflußzellen-System („Flow chamber“)

Der Aufbau und die Präparation der Anlage erfolgten wie in Christensen *et al.* (1999) beschrieben.

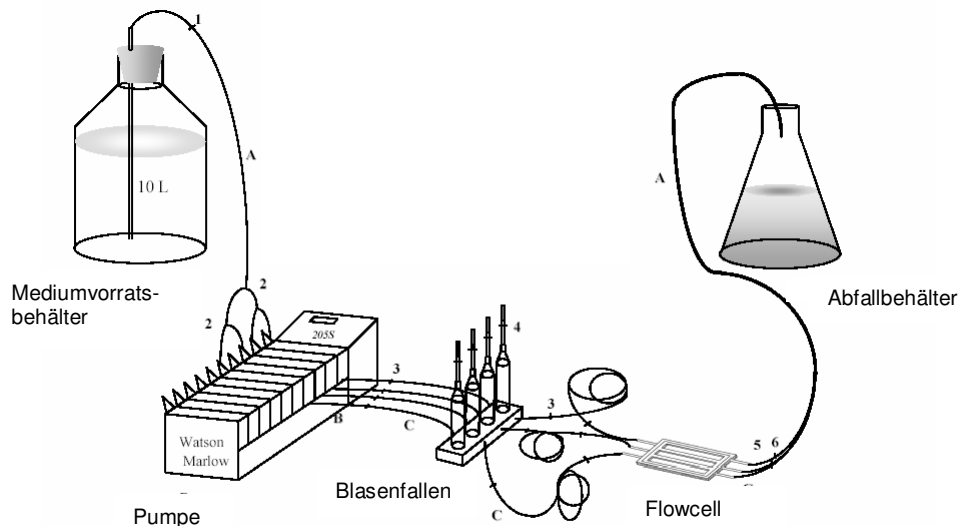


Abb.11: Aufbau der Biofilmanlage

In dem Mediumvorratsbehälter befindet sich das sterile Medium, welches über eine Schlauchpumpe (Firma Watson Marlow) ins System befördert wird. Anschließend passiert das Medium die so genannten Blasenfallen, in welchen bis dahin entstandene Luftblasen aufgefangen werden (Abb.12).

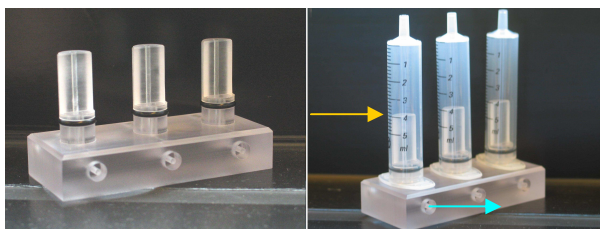


Abb.12: Detailfoto der Blasenfallen, Das Medium fließt (gelber Pfeil) in die mit Medium gefüllte Spritze, Blasen steigen nach oben und luftblasenfreies Medium fließt unten hinaus (blauer Pfeil) weiter zur Flowcell.

Würden Luftblasen durch den folgenden Schlauch weiter in die Durchflusszelle (Flowcell) transportiert werden, könnte der in den Kammern der Flowcell sich bildende Biofilm zerstört werden.

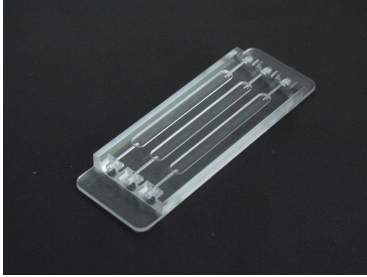


Abb.13: Detailfoto der Durchflusszelle

Die Flowcell besteht aus drei getrennten Kammern, welche von einem Deckgläschen bedeckt werden. Die Biofilmbildung erfolgt an der Unterseite des Deckgläschens und kann permanent mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (SCLM) beobachtet werden. Das Medium fließt am Boden der Kammer durch die Flowcell hindurch.

In dem mit Desinfektionsmittel (25 ml von 2,5%-igem Cetyl-Alkohol (Hexadecanol)) versehenen Abfallbehälter (5 l) werden das durch das System gepumpte Medium und die ausgespülten Bakterien wieder aufgefangen.

Das Medium, alle Schläuche, die Blasenfallen und die Flowcells werden getrennt autoklaviert und anschließend zusammengesteckt. Anstelle des Mediums wird vorerst zur weiteren Sterilisation 0,5%-iges Hypochlorid für 2 h (14 rpm) durch das System gepumpt. Nachdem anschließend das System mit 2 l sterilem MilliQ Wasser gespült wurde, erfolgte der Anschluss der Medienflaschen. Das fertige, unbeimpfte System wurde zum Temperieren und zum Testen, über Nacht bei 37°C mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,2 mm/s (bei der 12-Kanal-Pumpe) inkubiert. Verlief der Test positiv, konnte das System mit einer verdünnten, über Nacht gewachsenen Kultur beimpft werden.

Zum Beimpfen wurde die Pumpe ausgestellt und die Schläuche ca. 2 cm vor dem Eingang der Flowcell abgeklemmt. Der Schlauch zwischen Klemme und Eingang wurde mit 96%-igem Ethanol sterilisiert. Mit einer 0,5 ml Spritze wurden 150 µl der verdünnten Kultur ( $OD_{578}=0,1$ ) durch den Schlauch direkt in die jeweilige Kammer der Flowcell injiziert. Das Einstechloch wurde nach dem Beimpfen mit Ethanol desinfiziert und mit Silikon verschlossen. Damit sich die Bakterien an die Glasoberfläche anheften können erfolgte eine 1-stündige Inkubationszeit, bevor die Klemmen wieder gelöst und die Pumpe angestellt wurde.

Aufgrund des Nährstoffverbrauchs in der Flowcell entsteht ein Nährstoffgradient entgegengesetzt zur Fließrichtung. Während des mehrtätigen Versuchverlaufs muss deshalb regelmäßig überprüft werden, ob die Bakterien in die Schläuche direkt vor dem Eingang der Flowcell gelangen und dort die Nährstoffe verbrauchen, bevor sie in die Flowcell gelangen. Ist dies der Fall muss der betroffene Schlauch von der Flowcell abgetrennt, die bewachsenen Teile des Schlauches mittels eines sterilen Skalpells entfernt und der Schlauch wieder angeschlossen werden. Um die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung gering zu halten, wird während dieses Vorganges weiterhin Medium durch den Schlauch gepumpt.

Weiterhin ist zu beachten, dass die Blasenfallen durch zu viele Luftblasen nicht leer laufen und rechtzeitig mit sterilem Medium wieder aufgefüllt werden.

Wie im Biofilmaufbau unschwer zu erkennen ist, sind die Schläuche zwischen den Blasenfallen und den Flowcells besonders lang. Zu einem um die Ausbreitung einer Kontamination bis ins Medium zu verhindern und zum anderen, um die Biofilmbildung in den Flowcells unter dem konvokalen Laserscanning-Mikroskop beobachten zu können. Die Technik eines solchen Mikroskops erlaubt es, ein dreidimensionales Objekt in einen Stapel optischer konvokaler Schnittebenen zu zerlegen und diese einzelnen Ebenen zu scannen und zu analysieren. Somit konnte nicht nur die Biofilmbildung beobachtet, sondern auch die Dicke und Struktur analysiert werden. Dem Institut in Lyngby stand ein konvokales Laserscanning-Mikroskop Model TCS4D (Leica Lasertechnik) zur Verfügung. Zur Visualisierung und Bearbeitung der aufgenommenen Bilder wurde das Programm IMARIS software package (Firma Bitplane AG, Zürich, Schweiz) verwendet.

### **2.15.2 Visualisierung der Zellen im Biofilm**

Um die Biofilmbildung der Bakterien im Mikroskop besser beobachten zu können, wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies erfolgte auf zwei unterschiedlichen Wegen. Zu einem wurden ein konstitutiv exprimiertes *gfp*-Gen ins Genom der Stämme integriert, so dass lebende Zellen immer fluoreszieren, und zum anderen erfolgte ein sogenannter „Endpoint-stain“, bei welchem alle Zellen kurz vor dem Mikroskopieren mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt werden. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um das rot-fluoreszierende SYTO 62.

#### **2.15.2.1 Färbung mit SYTO 62**

Die SYTO-Farbstoffe diffundieren passiv durch die Zellwand in die Zelle und färben dort Nukleinsäuren (Homepage Molecular Probes: [www.probes.com](http://www.probes.com)). Da dies Einfluss auf das Zellwachstum hat, kann diese Färbemethode nur einmal am Ende des Versuches angewandt werden („Endpoint-stain“). Das Absorptionsmaximum von SYTO 62 liegt bei 652 nm und die maximale Emission ist bei 676 nm messbar (Homepage Molecular Probes: [www.probes.com](http://www.probes.com)).

Vor dem Mikroskopieren wurden mittels Injektionsspritze in jede Kammer der Flowcell sehr langsam 150 µl einer 5 µM SYTO 62-Lösung (Firma Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) gegeben. Der Ablauf erfolgte wie beim Beimpfen der Biofilmanlage. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die Pumpe wieder eingeschaltet und der restliche Farbstoff entfernt. Die fluoreszierenden Bakterien konnten dann im Mikroskop analysiert werden.

#### 2.15.2.2 Markierung der Zellen durch GFP mittels eines mini-Tn7 Transposon-Systems

Das dazu verwendete mini-Tn7 Transposon-System und die benutzen Konstrukte wurde von Koch *et al.* weiter entwickelt und 2001 veröffentlicht. Diese Konstrukte basieren auf die von Hojberg *et al.* (1999) und Boa *et al.* (1991) in ihren Veröffentlichungen beschriebenen Träger- und Helfer-Plasmide.

Von den zu markierenden Stämmen wurden elektrokompente Zellen hergestellt (s. Kapitel 2.11.2) und mittels Elektroporation gleichzeitig die beiden Plasmide pAKN68 und pAKN66 in die Zelle gebracht. Bei pAKN66 handelt es sich um das Trägerplasmid, welches zwischen Tn7L und Tn7R eine Gentamycin-Resistenzkassette und ein *gfp*-Gen enthält (pTn7-Gm-GFP). Die Bezeichnung pAKN68 steht für das Plasmid pUX-BF13, dem Helferplasmid. Das Helferplasmid enthält die für die Insertion des Transposons (mini-Tn7) wichtigen Gene *tnsABCDE* (Bao *et al.*, 1991). Nach der Selektion auf 60 µg/ml Gentamycin wurden die Stämme anschließend mikroskopisch auf ihre Fluoreszenz untersucht.

#### 2.15.3 Mikrotiterplatten-Test auf Biofilmbildung

Von einer über Nacht gewachsenen Kultur wurde eine neue Kultur mit einer OD<sub>600nm</sub> von 0,05 gestartet. Erreichte diese eine OD<sub>600nm</sub> von 0,6 - 0,7, erfolgte eine 1:100 Verdünnung mit frischem Medium. Anschließend wurde eine aus 96 Löchern bestehende Polystyren-Mikrotiterplatte (Serowel, Bibby Sterilin cat.no. 611V96) mit dieser verdünnten Zellsuspension (je 100 µl pro Loch) beimpft. Dabei wurden jeweils acht Löcher mit der gleichen Kultur gefüllt. Die restlichen Löcher wurden zur Kontrolle und zum Nullabgleich je nach Verfügbarkeit mit unbeimpftem Medium gefüllt, oder blieben leer. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht für mindestens 10 Stunden.

Die anaerobe Inkubation der Mikrotiterplatten fand in gasdichten Kunststofftöpfen statt. Um eine anaerobe Atmosphäre in den Töpfen herzustellen wurde Anaerocult der Firma Merck (Darmstadt) nach Herstellerangaben eingesetzt. Als Indikator für die anoxygene Atmosphäre wurde der Teststreifen Anaerotest der Firma Merck (Darmstadt) eingesetzt. Nachdem mit Schwung das Medium aus der Platte ausgeschüttet wurde, erfolgte der erste Waschschrift, indem die Löcher mittels Spritzflasche mit Wasser gefüllt wurden. Dabei sollte beachtet werden, dass nicht direkt auf den Boden der Löcher gespritzt wird, sondern an den oberen Rand. Das Waschwasser wurde wieder entfernt und die Platte auf Papiertüchern getrocknet. Somit wurden das Medium und die nicht anhaftenden Zellen entfernt. Die Färbung der in den Löchern zurückgebliebenen Zellen erfolgte für 15 min mit einer 125 µl einer 1%-igen Kristall-Violett-Lösung. Nach dem Entfernen der



Färbelösung schloss sich wieder ein Waschschrift mit einer Spritzflasche an. Bei den beiden folgenden Waschschriften wurde die Platte in ein Wasserbad getaucht und somit das restliche nicht gebundene Kristall-Violett entfernt. Die anhaftenden Zellen liegen jetzt violett gefärbt im Loch vor. Dem Trocknen auf Papierhandtüchern folgte die Zugabe von 200 µl 95%-igem Ethanol in jedes Loch. Ethanol löst den an den Zellen gebundenen Farbstoff wieder ab und nach mehrmaligem Spülen des Loches mit der Lösung wurden 100 µl davon in eine neue Mikrotiterplatte, mit gleicher Anordnung der Proben, überführt. Diese wurde dann in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Filter 590 nm) bei 600 nm ohne Deckel vermessen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Proteomanalysen von *Pseudomonas aeruginosa*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Umstellung von aerober auf anaerobe Lebensweise von *P. aeruginosa* mittels Proteomanalyse untersucht werden. Ziel ist es, verschiedene anaerobe Lebensweisen mit anaerober Energiegewinnung auf Proteinebene zu charakterisieren. Molekulare Strategien zur Anpassung und für den Übergang sollten abgeleitet werden.

##### 3.1.1 Etablierung der 2D-Gelelektrophorese

Zu Beginn dieser Arbeit lagen in unserem Labor keine Erfahrungen in der Proteomanalyse von *P. aeruginosa* vor. Aus diesem Grund mussten zunächst geeignete Versuchsprotokolle etabliert und optimiert werden. Dies betraf sowohl die Vorgehensweise bei der Herstellung zellulärer Proteinextrakte, deren Quantifizierung, die sinnvolle Auswahl von pH-Gradienten in der IEF und des Polyacrylamidgehaltes in der zweiten Dimension.

Weiterhin wurden unterschiedliche Färbemethoden für die getrennten Proteine getestet und ein geeignetes Computerprogramm für die quantitative Auswertung der Gele ausgewählt und etabliert.

##### 3.1.2 Zelluläre Proteinextrakte und deren Quantifizierung

Eine für die Proteomanalyse ideale Probe sollte nur Proteine enthalten und keine weiteren geladenen Biomoleküle wie Polynucleotide, Polysaccharide, Phospholipide oder Salze. Da *P. aeruginosa* als ein polysaccharidreiches Bakterium bekannt ist, wurde für die Präparation von Gesamtzellextrakten in der Literatur nach Protokollen gesucht, welche sich speziell auf dieses Bakterium beziehen und eine Entfernung der störenden Substanzen gewährleistet.

Im Protokoll von Hanna *et al.* (2000) wurde, nach dem Aufschluss der Zellen mittels French Press, vor der 2D-Gelelektrophorese noch eine Phenolextraktion durchgeführt. Dadurch wurden störende Substanzen entfernt und nach anschließender Acetonfällung und Zentrifugation lagen die gereinigten Proteine sedimentiert vor. Der Überstand zeigte keine Trübung. Um den Einfluss der Probenvorbereitung, besonders die Zeitspanne der Probenbehandlung, auf das Proteinsmuster so gering wie möglich zu halten, wurde das Protokoll auf seine Geschwindigkeit hin modifiziert und auf wenige Arbeitsschritte begrenzt. Dazu wurden die Zellen nicht mittels French Press aufgeschlossen sondern direkt durch die Zugabe von Phenol. Anschließend wurden die Proteine ebenfalls mit Aceton gefällt und durch Zentrifugation geerntet. Durch Zugabe der im Protokoll von

Hanna angegebenen Solubilisierungslösung (Rehydratisierungslösung a) konnten die Proteine wieder gelöst und für die anschließende Isoelektrische Fokussierung eingesetzt werden. Das modifizierte Protokoll ermöglicht auf Grund seiner wenigen Arbeitsschritte und seiner Einfachheit, das gleichzeitige Prozessieren mehrere Proben und erhöht so die Reproduzierbarkeit. Hinsichtlich dieser Vorteile und der erzielten Qualität der Gele wurde das modifizierte Protokoll für die Herstellung aller zellulären Proteinextrakte verwendet.

In der Proteomanalyse ist die möglichst genaue Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration eine wichtige Voraussetzung für den quantitativen Vergleich von Proteinmustern.

Für die Reproduzierbarkeit des Phenolaufschlusses ist es wichtig, gleiche Mengen an Zellen, bzw. an Protein einzusetzen. Um dies zu gewährleisten, wurden während der Zellernte, direkt nach der Aliquotierung von jedem Aliquot 60 µl separat für eine Proteinbestimmung eingefroren. Als gut reproduzierbar für eine Proteinbestimmung erwies sich der alkalische Zellaufschluss mit NaOH und die anschließende Proteinbestimmung mit Hilfe des BCA-(Bicinchoninic acid)-Tests (Van der Wauven *et al.*, 1984). Ein weiterer Vorteil ist der Verbrauch einer geringen Probenmenge. Diese Methode wurde hinsichtlich Temperatur und Inkubationszeit optimiert.

Da bei der anschließenden Phenolextraktion und Acetonfällungen Protein verloren gehen kann und dadurch größere Schwankungen zwischen den Proben hinsichtlich der Proteinkonzentration entstehen, ist es notwendig, direkt vor der 1. Dimension nochmals die Proteinmengen zu bestimmen und für die Elektrophorese abzugleichen.

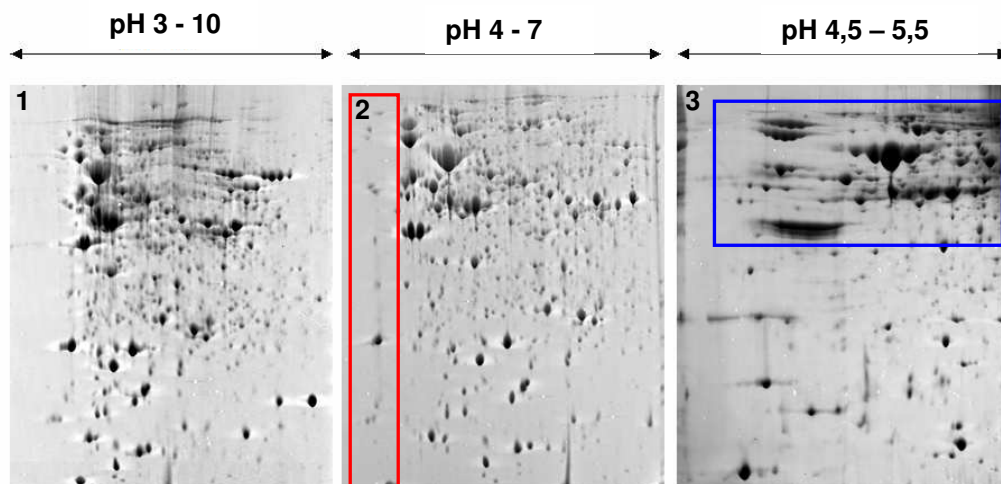
Um die Konzentration des nach der Fällung gelösten Proteins zu bestimmen wurden verschiedene in der biochemischen Literatur beschriebene Proteinbestimmungsverfahren getestet. Der schon bei der ersten Proteinbestimmung verwendete BCA-Test (Sigma-Aldrich) erwies sich als nicht reproduzierbar. Der im Probenpuffer in hoher Konzentration vorliegende Harnstoff (7 M) ist laut Hersteller nicht kompatibel mit dieser Bestimmungsmethode. Auch beim Bradford-Test (Roti-Quant, Fm. Roth) ist Harnstoff der störende Faktor. Die Konzentrations-Grenzwerte für Harnstoff im Probenpuffer liegen bei dem BCA-Test bei 3 M und bei dem Bradford-Test bei 6 M (Deutscher, 1990). Die durchgeführten UV-Absorptionsmessungen (s. Kap. 2.14.3.4) führten auch nicht zu einem zufrieden stellenden Ergebnis. Die mit dem Test tolerierte Konzentration an Harnstoff ist kleiner 1 M. Des Weiteren stört die zugesetzte Reagenz DTT (50 mM) ebenfalls die Bestimmung (Grenzwert: 3 mM; Deutscher, 1990). Die Konzentrationen beider Substanzen können jedoch nicht verringert werden, weil damit die Löslichkeit der Proteine reduziert wird. Harnstoff entzieht den Proteinen die Hydrathülle und dadurch werden diese in Kombination mit den Tensiden und DTT denaturiert.

Zeitgleich wurde ein Proteinbestimmungskit „Plus One 2-D Quant Kit“ von Amersham Biosciences angeboten, welcher wie vorgeschrieben angewendet wurde und reproduzierbare Ergebnisse lieferte. In diesem Test wird das eingesetzte Protein gefällt, die störenden Chemikalien entfernt und das Proteinsediment in einer alkalischen Kupferlösung resuspendiert. Die Kupferionen binden an die Peptidbindungen der Proteine und nicht gebundene Kupferionen reagieren mit der zugegebenen Färbelösung. Die Farbintensität dieser Lösung ist umgekehrt proportional zur Proteinkonzentration. Aufgrund der vorangehenden Fällung wirken sich die Puffersubstanzen und Additive nicht negativ auf den Test aus und man kann direkt vor der IEF die Proteinmengen abgleichen und somit das Auftragen gleicher Proteinmengen auf den pH-Gradienten-Streifen gewährleisten.

### 3.1.2.1 Auswahl geeigneter pH-Gradienten und Polyacrylamidkonzentrationen

Ein zweidimensionales Polyacrylamidgel kann stets nur einen Ausschnitt aus dem Gesamtproteom darstellen. Neben Faktoren wie der unzureichenden Menge oder der Hydrophobizität verschiedener in einer Probe enthaltener Proteine, ist dieser Ausschnitt durch die Auswahl der Auftrennungsbedingungen definiert.

In den anfänglichen Analysen wurde zunächst mit einem weiten pH-Gradienten (pH 3 - 10) gearbeitet. Im Proteinmuster dieser Gele zeigte sich eine Anhäufung der meisten Spots im Bereich zwischen pH 5 - 8 (siehe Abb.14, Gel 1).

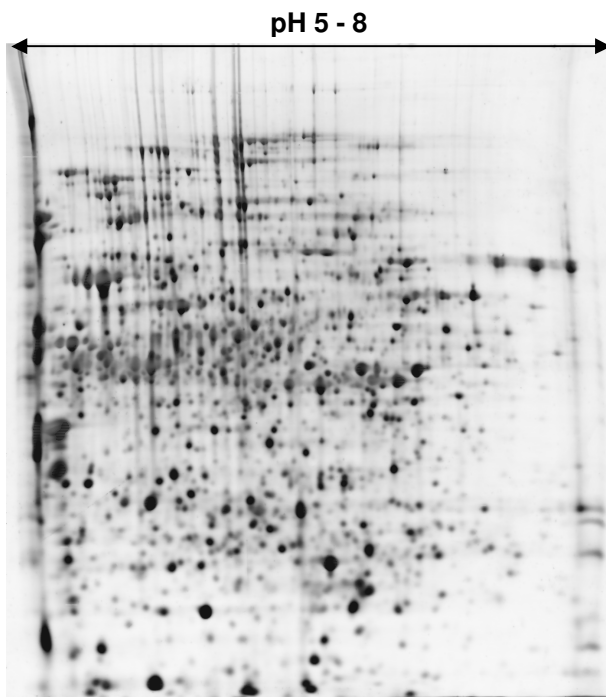


**Abb.14: 2D-Gele von *P. aeruginosa* Wildtyp-Zellen, welche unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM KNO<sub>3</sub> wuchsen.** 700 µg Protein (Bild 1 und 2) sowie 900 µg Protein (Bild 3) wurden in unterschiedlichen pH-Bereichen isoelektrisch fokussiert, in einer 12%-igen SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Mit Proteinen überladener Bereich ist durch ein blaues Rechteck gekennzeichnet. Ein rotes Rechteck markiert den sauren pH-Bereich mit geringer Anzahl an Proteinen.

Aus diesem Grund wurden weitere 2D-Analysen mit einem engeren pH-Gradienten (pH 4 - 7) durchgeführt. Durch die Auswahl von noch kleineren pH-Bereichen (pH 4,5 - 5,5 und 5,5 - 6,7) war es möglich, die Auftrennung in diesem Bereich noch weiter zu verbessern.

Wurden zur IEF engere pH-Bereiche (pH 4,5 - 5,5) eingesetzt, kam es bei den eingesetzten Proteinkonzentrationen (900 µg) im hochmolekularen Bereich zur Überladung des Gels durch Proteine (Abb.14, Gel 3, blaues Rechteck). Das Verringern der Proteinkonzentration bedingt jedoch den Verlust von Proteinen, welche in geringer zellulärer Konzentration vorliegen.

Bei gleichem Arbeitsaufwand ist die Anzahl der sichtbaren Proteine bei einem engen pH-Bereich, im Vergleich zu einem größeren Gradienten, relativ gering. Um einen geeigneten Mittelweg zwischen hoher Auflösung und höchst möglicher Anzahl an sichtbaren Proteinen in einem Gel zu finden, wurde für alle weiteren Proteomuntersuchungen ein mittlerer pH-Gradient gewählt. Im Gel 2 (Abb. 14) mit dem pH-Bereich 4 - 7 befinden sich im sauren pH-Bereich (rotes Rechteck) relativ wenige Spots, dagegen ergaben erste Protein-Identifizierungen, dass im Bereich zwischen 7 und 8 für den anaeroben Stoffwechsel wichtige Proteine liegen. In den weiteren Untersuchungen wurden deshalb alle Proteine mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 8 aufgetrennt (siehe Abb.15).



**Abb.15: 2D-Gele von *P. aeruginosa* Wildtyp-Zellen, welche unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM KNO<sub>3</sub> wuchsen. 500 µg Protein wurden in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in einer 10%-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS gefärbt.**

Weiterhin wurden verschiedene Acrylamidkonzentrationen bei der Herstellung der SDS-Gele für die 2. Dimension getestet. Nach dem anfänglichen Einsatz einer homogenen Acrylamidkonzentration von 12% wurde schließlich eine homogene Konzentration von

10% für alle weiteren Untersuchungen ausgewählt. Dies führte zu einer verbesserten Auflösung im hochmolekularen Bereich der Gele (siehe Abb.14 und 15).

### 3.1.2.2 Wahl der geeigneten Proteinfärbemethode

Anfänglich erfolgte die Detektion der Proteinspots mittels Coomassiefärbung. Die Färbung von Proteingelen mit kolloidalen Coomassie Brilliant Blau G-250 weist gegenüber der klassischen Färbemethode mit Blau R-250 die Vorteile höherer Sensitivität, verbesserter Quantifizierbarkeit und reduzierter Hintergrundfärbung auf (Rabilloud, 1999). Bei der Anfärbung von 2D-Gelen wurde deshalb auf die sensitivere kolloidale Coomassiefärbung zurückgegriffen. Basierend auf der Färbemethode nach Neuhoﬀ *et al.* (1988) wurde das im Kapitel 2.14.7.1 beschriebene Protokoll etabliert.

Laut Literatur gilt die Silberfärbung als die sensitivste Färbemethode von Proteinen (Rehm, 2000). Bei der Durchführung von Silbernitratfärbungen nach einem Protokoll von Rabilloud (1999) wurde jedoch deutlich, dass diese Methode schwer zu reproduzieren ist. Es gab starke Schwankungen im Hintergrund, wodurch einige Spots nicht mehr sichtbar waren. Da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben (Rehm, 2000) können diese auch untereinander nicht verglichen werden. Ein weiteres Problem stellten Proteine dar, welche in sehr großen Mengen vorliegen. Hier kommt es bei einer Silberfärbung häufig zu einem Effekt der Negativfärbung. Die Proteinspots werden in ihrem Zentrum häufig mit zunehmender Proteinmenge wieder heller.

Des Weiteren war eine Identifizierung von Silber gefärbten Proteinen mittels MALDI-TOF nicht ohne weiteren präparativen Aufwand möglich. Aus diesen Gründen wurde diese Färbung nicht weiter verwendet.

Die Fluoreszenzfärbung weist im Vergleich zur beschriebenen Coomassiefärbung den Vorteil höherer Sensitivität und besserer Quantifizierbarkeit der in den Proteinflecken enthaltenen Proteinmengen auf (Berggren *et al.*, 2002). Weiterhin können fluoreszenzgefärbte Proteine ohne zusätzlichen Aufwand für eine MALDI-Identifizierung genutzt werden. Aus finanziellen Gründen konnte jedoch auf die im Handel angebotenen fluoreszierenden SYPRO-Farbstoffe nicht zurückgegriffen werden.

Im Jahre 2001 veröffentlichten Rabilloud *et al.* die Synthese eines für die Färbung von 2D-Gelen geeigneten Fluoreszenzfarbstoffes, Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (RuBPS). Nachdem von Dr. M. Eschbach der Farbstoff in unserem Labor synthetisiert und ein einfaches, reproduzierbares Färbeprotokoll etabliert wurde, erfolgten alle weiteren Färbungen der 2D-Gele mit diesen Farbstoff (Eschbach, 2004 b).

### 3.1.2.3 Datenverarbeitung und Reproduzierbarkeit

Die Gele wurden nach der Digitalisierung mit Hilfe des Z3-Programmes (Version 3.0, Firma Compugen, Tel Aviv, Israel) ausgewertet. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

In der ersten Methode wurden zunächst die Referenzgele aus beiden untersuchten Zuständen ausgewählt und miteinander verglichen. Um zu klären, ob die Migration der Proteine in den Gelen des gleichen Zustands miteinander korreliert oder ob es starke Abweichungen gibt, wurden anschließend die Proteinmuster verschiedener Gele für einen Zustand miteinander verglichen. Der Vergleich der Proteinmuster eines Zustandes sollte weiterhin Aufschluss über die Varianz die Intensitäten des gleichen Proteins geben, die durch Aufarbeitung und experimentelle Durchführung entstand.

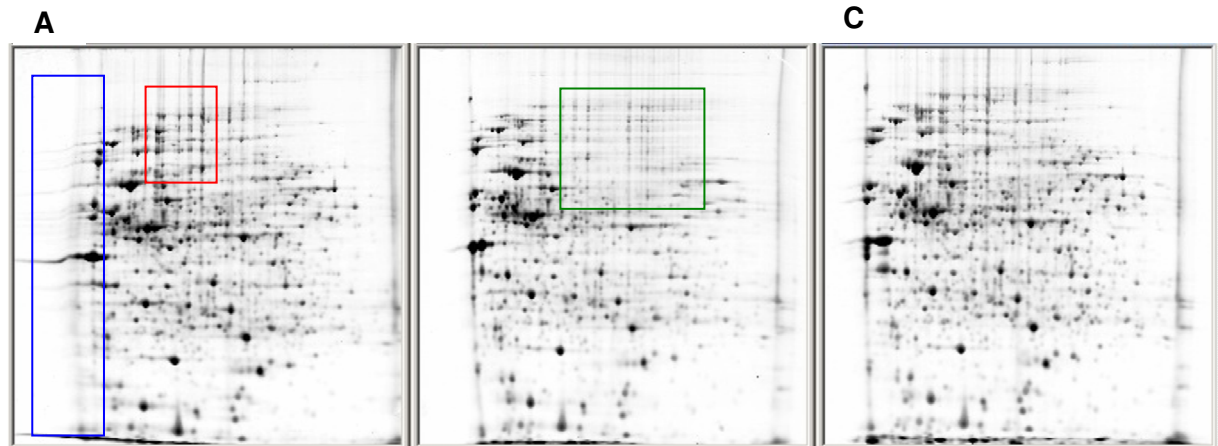
Für die zweite Methode wurden mit Hilfe des Programms „Raw Master Gele“ der beiden Zustände erstellt. Dazu wurden alle Gele für den ersten Zustand miteinander verglichen und damit ein Raw Master Gel erstellt. Genauso wurde mit allen Gelen des zweiten Zustands verfahren, bevor die beiden Raw Master Gele miteinander verglichen wurden. Der Vorteil dieser Methode basiert darauf, dass für die Auswertung der Gele nicht nur ein repräsentatives Gel genutzt wird, sondern alle entstandenen Gele einen Einfluss auf das Vergleichsmuster haben. Nach der Bildanalyse werden vom Programm folgende Werte berechnet und angegeben: Die RE-Werte („relative expression“) werden anhand von korrespondierenden Regionen auf zwei verschiedenen Gelen berechnet und sind ein Maß für die Menge des gebildeten Proteins unter der jeweilig analysierten Bedingung. Der RE-Wert ist absolut und kann in ppm-Einheiten ( $\mu\text{g/g}$ ) angegeben werden. Er erlaubt es daher auch die Produktion zweier unterschiedlicher Proteine in einem Gel miteinander zu vergleichen.

Der DE-Wert („differential expression“) beschreibt den Unterschied in der Proteinkonzentration für ein analysiertes Protein zwischen zwei analysierten Bedingungen (A und B). Ein DE-Wert von 1 entspricht dabei dem Zustand, dass das Protein in beiden Bedingungen in gleicher Menge vorhanden ist. Werte oberhalb von 1 bezeichnen Proteine, deren Bildung unter der Bedingung B verstärkt erfolgt, Proteine mit Werten unter 1 werden unter der Bedingung A stärker gebildet.

In allen folgenden Auswertungen werden sowohl die RE-Daten als auch die DE-Werte angegeben.

Um die Reproduzierbarkeit der etablierten Methode zu überprüfen wurde folgendes Experiment durchgeführt. Von einem Kulturaliquot wurde das Protein gefällt, dieses in entsprechender Menge an Solubilisierungspuffer gelöst und anschließend in drei gleiche Volumina geteilt. Demzufolge sollte es sich hierbei um drei identische Proteinproben handeln, welche auf 2D-Gelen aufgetrennt und anschließend verglichen werden können.

Unterschiede in der Proteinfällung und Solubilisierung der Proteine haben auf das Ergebnis keinen Einfluss, einzig die 2D-Gelelektrophorese und die anschließende Färbung, werden hiermit auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft. In folgender Abbildung sind die drei Gele dargestellt.



**Abb.16: 2D-Gele von *P. aeruginosa* Wildtyp-Zellen, welche unter aeroben Bedingungen wuchsen.** Pro Gel wurden 500 µg gefälltes Protein der gleichen Probe in einem pH-Bereich von 5-8 isoelektrisch fokussiert, in einer 10%-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS gefärbt. Nicht reproduzierbarer Randbereich ist in Bild A mit einem blauen Rechteck gekennzeichnet. Rotes und grünes Rechteck zeigen ebenfalls nicht reproduzierbare Bereiche.

Beim Vergleich der Gele wird deutlich, dass bestimmte Bereiche nicht reproduzierbar aufzutrennen und anzufärben sind. Dies betrifft den sauren Randbereich (pH 5), welcher im ersten Bild keine deutliche Begrenzung zeigte (Abb.16 Bild A, blaues Rechteck). In den Randbereichen des IEF-Streifens sammeln sich die Proteine, die entweder saurer oder basischer als die Proteine sind, die der pH-Gradient auftrennt. Auch in anderen Versuchen wurde deutlich, dass der Randbereich, vor allem im sauren Milieu nicht immer das gleiche Muster zeigte. Für weitere Analysen wurden deshalb die sauren Randregionen eines Gels nicht berücksichtigt.

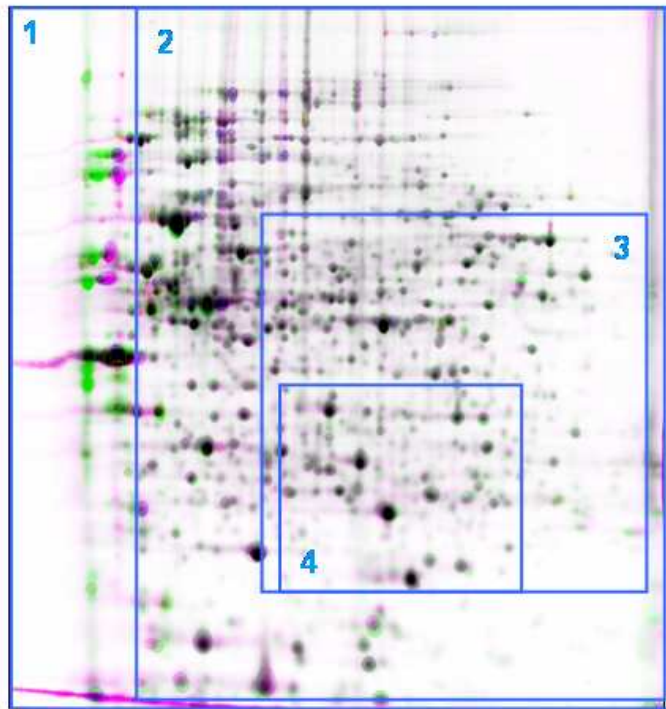
Weitere Analysen der eingescannten 2D-Gele mit dem Programm Z3 ergaben, dass nicht nur im Randbereich das Proteinmuster unterschiedlich ist, sondern auch in mittleren Regionen, wo z.B. vertikale Streifenbildung zu beobachten war (Abb.16 Bild A, rotes Rechteck). Auch in anderen Bereichen (Abb.16 Bild B, grünes Rechteck) konnten hochmolekulare Proteine nicht immer mit befriedigenden Ergebnissen aufgetrennt und visualisiert werden.

Das Programm Z3 erstellt bei der Analyse von 2D-Gelen ein Differential Expression (DE) Histogramm. In diesem Histogramm wird die Verteilung (in %) der DE-Werte aller Spots dargestellt. Die DE-Werte auf der X-Achse sind als LOG zur Basis 2 dargestellt, d.h. die Unterteilung von -4 bis +4 entsprechen den DE-Werten von 1/16 bis 16. Bei der

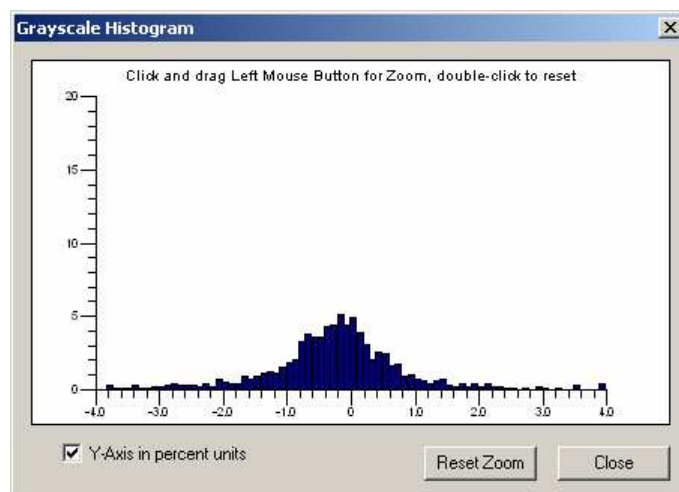


Auftrennung identischen Proben, sollte ein und dasselbe Protein in verschiedenen Gelen gleich stark vorhanden sein, d.h., die DE-Werte sollten 1 betragen. Da der  $\text{LOG}(1; 2)$  gleich 0 ist, entspricht der DE-Wert von 1 auf der X-Achse der Zahl 0.

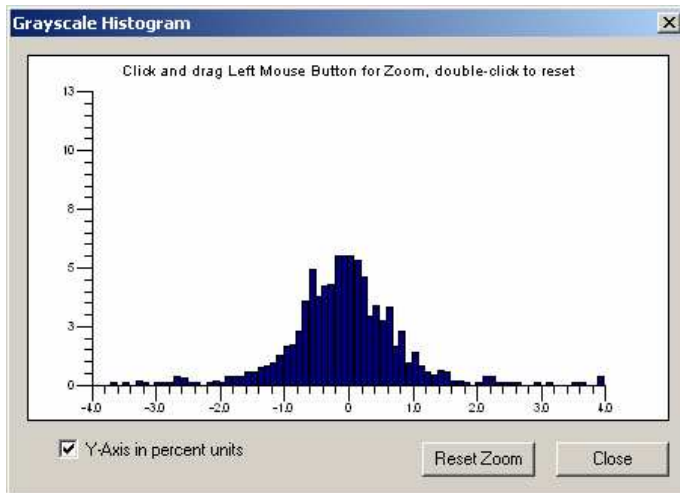
Dass bestimmte Bereiche im Gel nicht reproduzierbar aufgetrennt werden und es Unterschiede hinsichtlich des Proteinmusters zwischen zwei identischen Proben gibt zeigen auch die Histogramme. Folgende Abbildung (17) zeigt das übereinander gelegte Bild der Gele A und C (Abb.16). Von den blau eingezeichneten Rechtecken 1 bis 4 wurde jeweils das DE-Histogramm erstellt und analysiert.



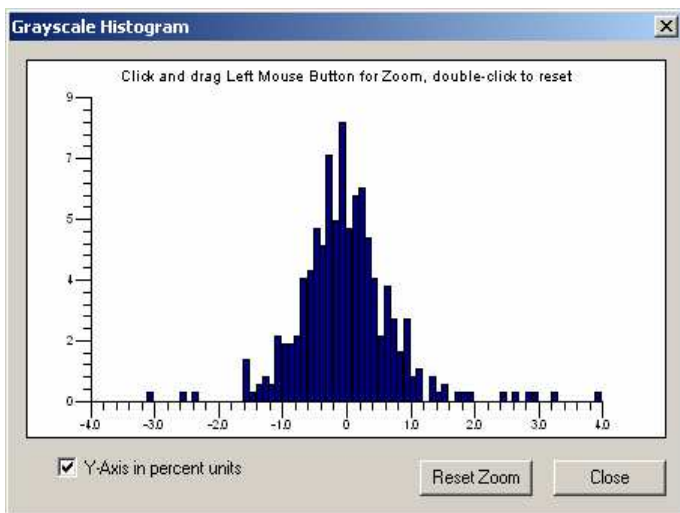
**Abb.17: Vergleich zweier 2D-Gele, welche aus einer Proteinprobe hergestellt wurden.** Pro Gel wurden 500  $\mu\text{g}$  gefälltes Protein der gleichen Probe in einem pH-Bereich von 5-8 isoelektrisch fokussiert, in einer 10%-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS gefärbt. Das Gel wurde in vier Bereiche (blaue Rechtecke 1-4) gegliedert und diese separat ausgewertet.



**Abb.18: Verteilung aller DE-Werte der Proteine im blauen Rechteck 1 (Abb.17).** Die DE-Werte auf der X-Achse sind als  $\text{LOG}$  zur Basis 2 dargestellt, und die Y-Achse gibt den prozentualen Anteil der Proteine eines DE-Wertes im Verhältnis zu allen Proteinen wieder.



**Abb.19: Verteilung aller DE-Werte der Proteine im blauen Rechteck 2 (Abb.17).** Die DE-Werte auf der X-Achse sind als LOG zur Basis 2 dargestellt, und die Y-Achse gibt den prozentualen Anteil der Proteine eines DE-Wertes im Verhältnis zu allen Proteinen wieder.

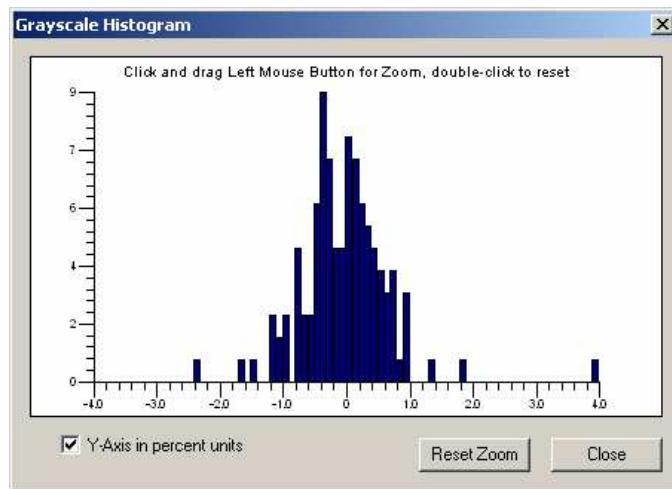


**Abb. 20: Verteilung aller DE-Werte der Proteine im blauen Rechteck 3 (Abb.17).** Die DE-Werte auf der X-Achse sind als LOG zur Basis 2 dargestellt, und die Y-Achse gibt den prozentualen Anteil der Proteine eines DE-Wertes im Verhältnis zu allen Proteinen wieder.

Das Histogramm (1, Abb. 18) aller Proteine der beiden Gele (Rechteck 1) zeigt eine Gaussche Verteilung der DE-Werte über die gesamte X-Achse von -4 bis +4, wobei es zu einer Anhäufung in dem Bereich zwischen -1 und +1 kommt. Wenn man den sauren Randbereich vernachlässigt und nur die Proteine des Rechteckes 2 in das Histogramm (2, Abb. 19) einbringt, verteilen sich die DE-Werte weiterhin über die gesamte X-Achse. Erst wenn man die mittlere Region, wo es zur vertikalen Streifenbildung kommt ausschließt (Rechteck 3), nimmt die Verteilung in den Randbereichen des Histogramms (3, Abb. 20) ab und konzentriert sich mehr auf den Bereich zwischen -1 und +1. Dennoch sind auch hier einige Proteine dabei, deren DE-Werte bis +4 gehen, das heißt, die bis zu 16-fach induziert sind. Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei diesen nicht um Proteine mit geringem Kontrast zum Hintergrund und geringer Pixelgröße handelt. Vielmehr scheint die Qualität der Auftrennung Einfluß auf die Verteilung der DE-Werte zu nehmen.

Doch selbst bei sehr guter Auftrennung in kleinen Gelbereichen (Rechteck 4), gibt es immer noch vereinzelt Proteine, deren DE-Werte eine Induktion angeben. Die meisten

Proteine liegen in der Region um 0, erstrecken sich jedoch auf einen Bereich zwischen – 1 und +1. Diese Werte entsprechen den DE-Werten 0,5 bis 2 (Abb.21).



**Abb. 21: Verteilung aller DE-Werte der Proteine im blauen Rechteck 4 (Abb.17).** Die DE-Werte auf der X-Achse sind als log2 dargestellt, und die Y-Achse gibt den prozentualen Anteil der Proteine eines DE-Wertes im Verhältnis zu allen Proteinen wieder.

Beim Vergleich weiterer Gele gleichen Zustandes zeigten die DE-Histogramme eine ähnliche Verteilung. Da die meisten Proteine aufgrund experimenteller Schwankungen zwischen einem DE-Wert von 0,5 - 2 liegen, wurden nur Veränderungen der Proteinkonzentration oberhalb, bzw. unterhalb dieser Werte als eine signifikante Änderung der Proteinsynthese betrachtet. Jedes identifizierte und analysierte Protein wurde hinsichtlich seiner Induktion in Parallelansätzen kontrolliert. Nur wenn der DE-Wert eines Proteins bei den Gelen mit identischen Ansätzen innerhalb des angegebenen Bereiches (0,5 - 2) lag, wurde es für weitere Vergleiche genutzt.

Gelegentlich wurden von einem Zustand nur zwei parallele Ansätze durchgeführt, welche für die Kontrolle eines Proteins von Interesse ausreichend sind. Empfehlenswert ist jedoch die Anfertigung und Auswertung drei paralleler Ansätze eines Zustandes.

Anhand der beschriebenen Versuche und Untersuchungen konnte ein gut reproduzierbares Protokoll für die Proteomuntersuchungen von *P. aeruginosa* etabliert werden. Bedingt durch den experimentellen Aufwand (Zellzüchtung und -ernte, isoelektrische Fokussierung, SDS-PAGE und Färbung) unterliegt das Proteinmuster dennoch gewissen Schwankungen. Die Analysen der Bilder A, B und C (Abb.16) zeigten, dass bestimmte Bereiche im Gel schlechter aufgetrennt werden und für eine Auswertung weniger geeignet sind.

Um diese Schwankungen innerhalb eines Zustandes auszugleichen, erlaubt das Programm Z3 das Erstellen eines Mastergels. Dazu werden die ausgewählten Gele eines Zustandes verglichen und die Daten in einem Gel vereinigt dargestellt. Wenn möglich wurde die Option zum Vergleichen zweier Zustände genutzt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das etablierte Protokoll (Kapitel 2.14) für die folgenden Proteomuntersuchungen des anaeroben Stoffwechsels von *P. aeruginosa* verwendet.

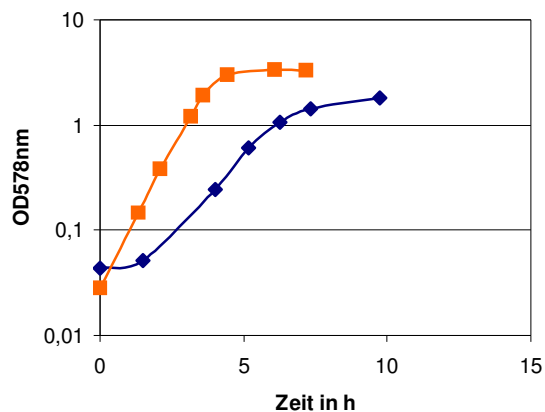
### 3.1.3 Analyse des Proteoms von *P. aeruginosa* (PAO1) unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB

Um das Proteom von *P. aeruginosa* Wildtyp unter denitrifizierenden Bedingungen zu analysieren wurden die 2D-Gele von aerob wachsenden Zellen mit denen von anaerob, mit Nitrat als alternativen Elektronenendakzeptor, wachsenden Zellen verglichen. Zunächst wurden die Bakterien unter folgenden Wachstumsbedingungen inkubiert, geerntet und die Proteine für 2D-Gel-Analysen präpariert. Von jedem Ansatz wurden zwei parallele Kulturen aufgearbeitet und ausgewertet.

**Tab.8: Wachstumsbedingungen der *P. aeruginosa* Wildtypkulturen unter aeroben und anaeroben Bedingungen**

| Bedingung                     | Aerober Ansatz | Anaerober Ansatz                 |
|-------------------------------|----------------|----------------------------------|
| Medium                        | LB             | LB                               |
| e-Akzeptor                    | Sauerstoff     | Nitrat (50 mM KNO <sub>3</sub> ) |
| OD <sub>578nm</sub> Zellernte | 0,5            | 0,5                              |
| Aufgetragene Proteinmenge     | 700 µg         | 700 µg                           |
| pH-Gradienten                 | 5 - 8          | 5 - 8                            |
| Polyacrylamidkonz.            | 12%            | 12%                              |

Unter den in Tab.8 beschriebenen Inkubationsbedingungen konnten die in folgender Abbildung (Abb.21) dargestellten Wachstumskurven aufgenommen werden.



**Abb.21: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* unter aeroben (—■—) und anaeroben (—■—) Bedingungen in LB- Medium mit 50 mM Nitrat im anaeroben Ansatz.**

Wenn *P. aeruginosa* Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet, beträgt die Generationszeit in LB-Medium 35,4 min, verwendet er dagegen Nitrat als Elektronenakzeptor steigt die Generationszeit auf 64,2 min an.

Der Grund für diesen Unterschied ist, dass die freie Energie, die durch die Oxidation von NADH verfügbar wird, mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor größer ist als bei der Verwendung anderer Akzeptoren (z.B. Nitrat) mit geringerem Redoxpotential. Das bedeutet, dass der Energiegewinn pro mol Glukose mit Nitrat als Elektronenakzeptor geringer ist, als bei der aeroben Atmung mit Sauerstoff.

Stellt man den Energiegewinn beider Reaktionen in *Pseudomonas*-Stämmen gegenüber, wird deutlich, dass während der Denitrifikation 32% weniger Energie entsteht (Abb.22).

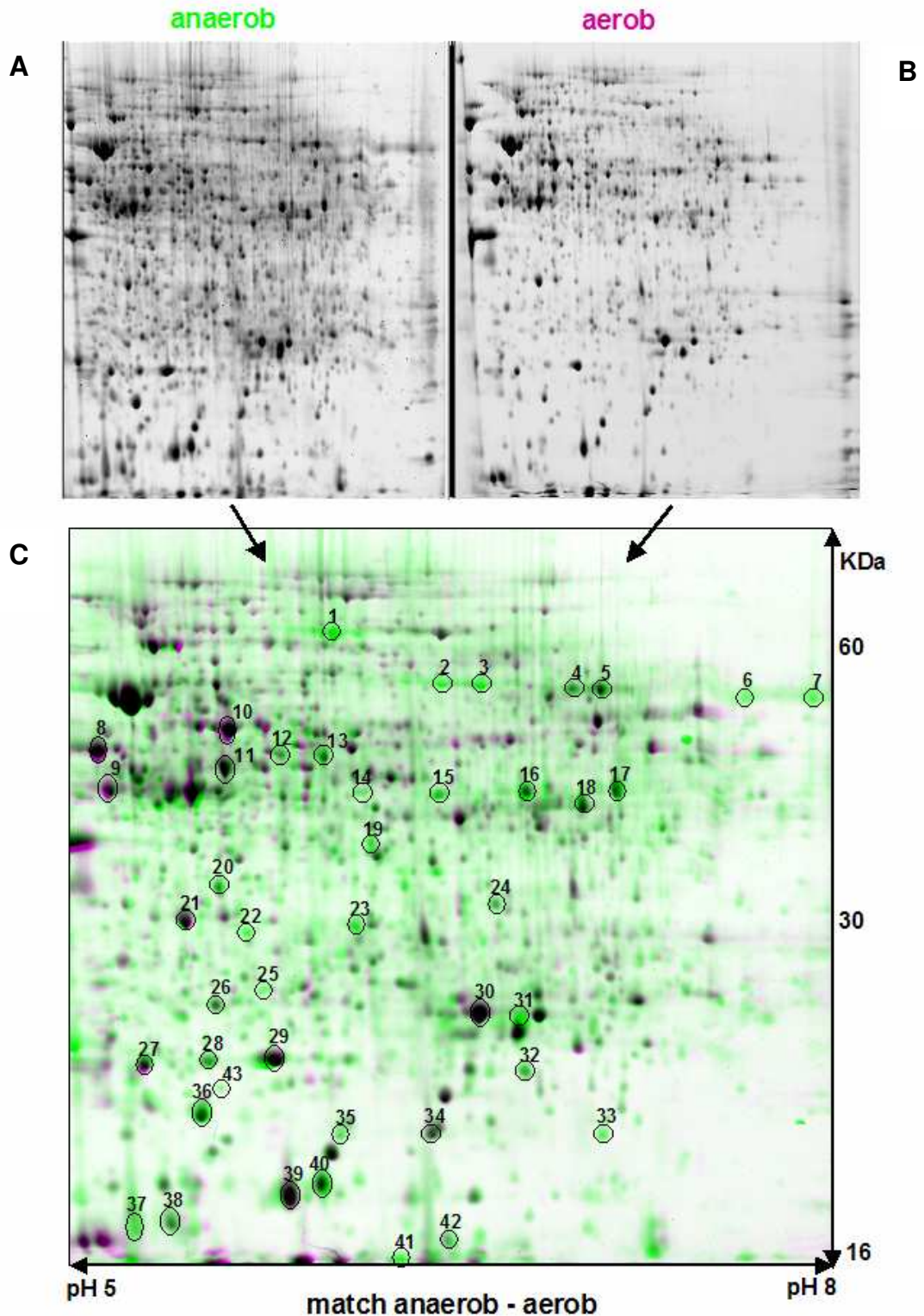
|                        | E <sub>0</sub> ' (mV)                           |             |   |
|------------------------|---|-------------|---|
| <b>Aerobe Atmung</b>   | <b>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O</b>             | <b>+820</b> | <b>ΔG<sub>0</sub>' = -2830 kJ/mol Glukose</b> |
| <b>Denitrifikation</b> | <b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/N<sub>2</sub></b> | <b>+751</b> | <b>ΔG<sub>0</sub>' = -1932 kJ/mol Glukose</b> |

**Abb.22 : Vergleich von aerober Atmung mit der Denitrifikation in Bezug auf die Energiegewinnung bei *Pseudomonas*-Stämmen** (Lengeler et al., 1999)

Die Zellernte für die 2D-Gele erfolgte in der logarithmischen Phase bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5. In dieser Phase sollten alle für *P. aeruginosa* unter denitrifizierenden Bedingungen zum Wachstum essentiellen Proteine synthetisiert werden. Der Zeitpunkt der Zellernte stellt die Mitte der exponentiellen Wachstumskurve dar und bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 1,0 veränderte sich die Generationszeit nicht. Demnach sollten geringe Abweichungen in der optischen Dichte zum Zeitpunkt der Zellernte keinen großen Einfluss auf das Proteinmuster haben.

Bei der digitalen Bildanalyse legt das Programm die miteinander zu vergleichenden Gele übereinander (das sogenannte „matchen“), wobei die Spots in einem Gel rot und im anderen Gel grün eingefärbt werden. Existiert ein Spot in beiden Gelen, wird dieser durch die Überlappung schwarz dargestellt. In folgender Abbildung sind zuerst die beiden einzelnen Proteinmuster aus aerob (Bild B) und anaerob (Bild A) wachsenden *P. aeruginosa* Kulturen dargestellt. Nachdem das Programm Z3 die aerob gebildeten Proteine rot und die anaerob gebildeten Proteine grün darstellte, entstand nach dem Übereinanderlegen beider Bilder das Bild C (Abb.23).





**Abb.23: Direkter Vergleich der Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtypzellen aus aerob und anaerob wachsenden Kulturen in LB-Medium.**

Es wurden jeweils 700 µg Protein in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 12 %-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung visualisiert. A: Proteinmuster von anaeroben mit 50 mM Nitrat wachsenden Zellen, B: Proteinmuster von aerob wachsenden Zellen, C: Überlagerung beider Gele, wobei Bild A (anaerob) in grün und Bild B (aerob) in rot dargestellt sind. Identische Proteinmengen führen bei der Überlagerung zu schwarzen Proteinflecken.

Deutlich unterschiedlich synthetisierte Proteine wurden aus dem Gel ausgestochen, tryptisch verdaut und mittels MALDI identifiziert. Von 12 weiteren Proteinen, die keine unterschiedlichen Intensitäten in beiden Gelen aufwiesen, erfolgte ebenfalls ein Verdau und deren Identifizierung.

Die eindeutig bestimmten Proteine sind in Abb.23 Bild C durch Umrandung mit schwarzen Kreisen gekennzeichnet und nummeriert. In den nun folgenden Tabellen sind zu den identifizierten Proteinen weitere Informationen zu finden. Dies umfasst die PA-Nummer, welche die Lage im Genom bestimmt, den Namen des Proteins, die theoretischen pI-Werte und Molekularmassen (Mw), sowie die DE-, und RE-Werte. In der ersten Spalte befindet sich die Nummer aus dem Gelbild. Anhand der DE-Werte erfolgt eine Unterteilung der Proteine in drei Gruppen:

- anaerob induzierte (DE-Werte < 0,5),
- aerob induzierte (DE-Werte > 2) und
- unregulierte Proteine (DE-Werte zwischen 0,5 und 2).

### **3.1.3.1 Gruppe 1: Anaerob induzierte Proteine bei Wachstum in Vollmedium mit Nitrat**

Als Ergebnis der Analyse konnten 22 unterschiedliche Proteine identifiziert werden, deren Bildung unter denitrifizierenden Bedingungen induziert sind. Bei den übrigen drei Proteinen handelt es sich um Fragmente bzw. modifizierte Formen der bereits identifizierten Proteine.

Sechs der induzierten Proteine wurden bisher noch nicht weiter beschrieben. Es handelt sich hierbei um die hypothetischen Proteine PA0423, PA1550, PA1677, PA3309, PA5496 und PA5497. Im Falle des hypothetischen Proteins PA3309 wurde von Kerstin Schreiber während ihrer Diplomarbeit durch Protein-BLAST nach ähnlichen Proteinen in der NCBI-Datenbank gesucht. Dabei wurden Übereinstimmungen zu Domänen aus Proteinen der „universal stress protein family“ gefunden, die sich über die gesamte Aminosäuresequenz des PA3309 erstrecken und auf eine mögliche Funktion als Stressprotein hinweist. Die exakte biologische Funktion hingegen bleibt weiterhin unbekannt.

Promoteranalysen von Richard Münch (Abtlg. Bioinformatik) zeigten potentielle Bindestellen für den Sauerstoffregulator Anr vor den Genen von PA3309, PA5496 und PA5497. Diese Vorhersagen stehen im Einklang mit der verstärkten Synthese dieser Proteine unter anaeroben Bedingungen.

Das Protein PA3529 hat eine hohe Ähnlichkeit (88%) zu der Alkylhydrogen-Peroxid-Reduktase von *Legionella pneumophila* und wurde daher als mögliche Peroxidase TsaA annotiert, die exakte biologische Funktion in *P. aeruginosa* ist jedoch noch unklar.

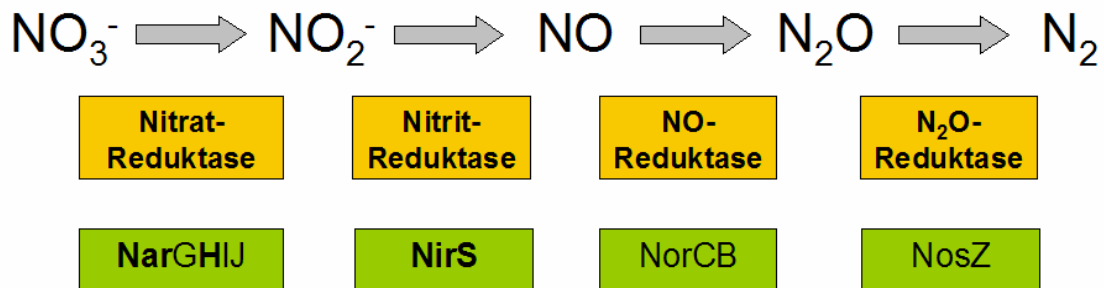
**Tab.9: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps in LB-Medium im Vergleich zu aeroben Bedingungen unter denitrifizierenden Bedingungen induziert wurden.**

Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb.23), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein   | pl theor. | Mw theor. | RE anaerob | RE aerob | DE          |
|----|------|---|-----------|-----------|------------|----------|-------------|
| 1  | 5497 | hypothetisches Protein                            | 5,67      | 82,71     | 3068       |          | -           |
| 2  | 3874 | NarH Respiratorische Nitratreduktase (beta chain) | 5,71      | 58,08     | 1473       |          | -           |
| 3  |      | NarH  |           |           | 2516       |          | -           |
| 6  | 1781 | NirB Assimilatorische Nitritreduktase (große UE)  | 6,32      | 89,67     | 1300       |          | -           |
| 7  | 0519 | NirS Nitritreduktase                              | 8,26      | 62,63     | 1030       |          | -           |
| 14 | 0291 | OprE anaerob induz. Porin der äußeren Membran     | 8,93      | 49,64     | 1163       | 63       | <b>0,04</b> |
| 15 |      | OprE  |           |           | 2654       | 928      | <b>0,28</b> |
| 17 |      | OprE  |           |           | 5506       | 1750     | <b>0,25</b> |
| 19 | 5427 | AdhA Alkohol-Dehydrogenase                        | 5,48      | 35,89     | 1464       | 97       | <b>0,05</b> |
| 20 | 5173 | ArcC Carbatkinase                                 | 5,02      | 33,06     | 3126       | 1029     | <b>0,26</b> |
| 22 | 0520 | NirQ regulatorisches Protein NirQ                 | 5,13      | 28,88     | 1267       |          | -           |
| 23 | 0024 | HemF Coproporphorynogen III Oxidase, aerob        | 5,49      | 34,75     | 1477       | 386      | <b>0,21</b> |
| 25 | 0888 | AotJ Arginin/Ornithin Bindeprotein AotJ           | 6,75      | 27,99     | 739        |          | -           |
| 28 | 3529 | TsaA probl. Peroxidase                            | 5,22      | 21,8      | 3903       | 2100     | <b>0,43</b> |
| 31 | 5496 | hypothetisches Protein                            | 5,96      | 24,86     | 4505       |          | -           |
| 32 | 1677 | hypothetisches Protein                            | 6,05      | 21,01     | 3481       | 1707     | <b>0,39</b> |
| 33 | 3915 | MoaB1 Molybdopterin-Biosynthese Protein B1        | 6,49      | 19,65     | 2597       |          | -           |
| 35 | 0423 | YceI konserviertes hypothetisches Protein         | 6,08      | 20,76     | 1816       | 176      | <b>0,08</b> |
| 36 | 4366 | SodB Superoxid Dismutase                          | 5,12      | 21,33     | 10017      | 5350     | <b>0,42</b> |
| 37 | 4235 | BfrA Bacterioferritin                             | 4,8       | 17,92     | 3029       |          | -           |
| 38 | 3531 | BfrB Bacterioferritin                             | 4,82      | 18,53     | 5099       | 2319     | <b>0,36</b> |
| 40 | 3309 | konserviertes hypothetisches Protein              | 5,31      | 16,48     | 9131       | 5081     | <b>0,44</b> |
| 41 | 4922 | Azu Azurin  | 6,49      | 15,99     | 3329       |          | -           |
| 42 | 4764 | Fur Eisenaufnahme-Regulationsprotein              | 5,54      | 15,21     | 2925       | 1387     | <b>0,38</b> |
| 43 | 1550 | hypothetisches Protein                            | 5,14      | 20,32     | 432        |          | -           |

Des Weiteren konnten Proteine identifiziert werden, die direkt an der Nitratatmung beteiligt sind. Dazu gehören eine Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase (NarGHIJ) und die respiratorischen Nitritreduktase NirS. Beide Enzyme spielen eine wichtige Rolle während der Denitrifikation, denn sie katalysieren in *P. aeruginosa* die ersten beiden Schritte bei der Umsetzung von Nitrat zu molekularen Stickstoff (siehe Abb.24).





**Abb.24: Reaktionen der Denitrifikation mit dazugehörigen Enzymen (gelb) und Untereinheiten der Enzyme (grün) in *P. aeruginosa*.** Die identifizierten Proteine NarH und NirS wurden fett hervorgehoben.

Die Proteine NarH (Protein-Nr. 2 und 3) und NirS (Protein-Nr. 7) werden nur unter anaeroben Bedingungen gebildet und sind aerob nicht nachweisbar. Daher werden in der Tabelle 9 keine DE-Werte, sondern jeweils nur ein RE-Wert angegeben.

Die membranassoziierte, respiratorische Nitratreduktase leitet die Elektronen von dem Chinon kommend über NarI an NarH weiter und pumpt dabei Protonen ins Periplasma. Über die Fe-S-Zentren werden die Elektronen weiter auf NarG übertragen, wo am Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid Kofaktor die eigentliche Reduktion von Nitrat zu Nitrit stattfindet (Moreno-Vivian *et al.*, 1999, Richardson, 2000). Die Expression dieser Gene erfolgt unter sauerstofflimitierenden Bedingungen und wird über das Nitratsensorsystem NarXL reguliert (Krieger, 2001).

Die Nitritreduktase NirS ist ein Cytochrom vom Typ *cd<sub>1</sub>*, welches die Elektronen vom Cytochrom *c<sub>551</sub>* oder vom Azurin erhält und Nitrit zu NO reduziert. Die Expression erfolgt unter anaeroben Bedingungen und ist durch Nitrat und Nitrit induzierbar (Arai *et al.*, 1991). Die anaerobe Induktion wird direkt über Dnr reguliert, wobei Anr über die Anr-Dnr-Regulationskaskade einen indirekten Einfluss ausübt (Arai *et al.*, 1997).

Das durch die Nitritreduktase freigesetzte NO ist für die Zelle hoch toxisch und wird deshalb durch die membranständige NO-Reduktase NorCB sofort zu N<sub>2</sub>O umgesetzt. Zwischen den Strukturgenen beider Reduktasen befinden sich drei weitere Gene, *nirQOP*. Das als Regulator identifizierte Protein NirQ wird benötigt für die posttranslationale Aktivierung der NO-Reduktase und man nimmt an, dass NirQ über diesen Einfluss für ein Gleichgewicht zwischen der Expression von *nirS* und *norCB* sorgt. Dadurch soll eine Anhäufung des toxischen NO vermieden werden (Arai, *et al.*, 1999). Das Regulatorprotein NirQ ist unter anaeroben Bedingungen induziert und wird über die

Anr/Dnr-Kaskade reguliert (Arai *et al.*, 1997). Die anaerobe Induktion konnte durch diesen Versuch ebenfalls bestätigt werden. Im Gel als Nr. 22 markiert, wird NirQ nur unter anaeroben Bedingungen synthetisiert.

Eines für den Elektronentransfer wichtiges Protein ist das blaue Kupfer-Protein Azurin (Protein-Nr. 41). Azurin ist ein Elektronendonator für die kupferhaltige Nitritreduktase in *P. aureofaciens* (Zumft, 1997). Obwohl Azurin keinen obligaten Redoxpartner für die Nitritreduktase in *P. aeruginosa* darstellt (Vijgenboom *et al.*, 1997), kann es dennoch als Elektronendonator für NirS (Parr *et al.*, 1977, Zumft, 1997) dienen.

Expressionsanalysen zeigten, dass das *azu*-Gen während des anaeroben Wachstums und beim Übergang von exponentieller zu stationärer Phase induziert wird (Vijgenboom *et al.*, 1997). Nitrat und Nitrit haben keinen Einfluss auf die Expression. Beide *azu*-Promotoren (P1 und P2) werden durch den Sigmafaktor S, und P1 zusätzlich durch Anr, reguliert (Vijgenboom *et al.*, 1997). Aufgrund dieses Expressionsprofils wird für Azurin eine Funktion beim Elektronentransfer während Redox-Stressreaktionen postuliert (Vijgenboom *et al.*, 1997).

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass NO eine oxidative Stressantwort induziert (Nunoshiba *et al.*, 1993). Da in *P. aeruginosa* während der Denitrifikation ebenfalls NO entsteht, wird vermutet, dass eine durch NO bedingte Stressantwort eine erhöhte Expression von *azu* auslöst (Vijgenboom *et al.*, 1997).

Die auch in diesen Proteomanalysen verzeichnete starke Induktion von Azurin unter anaeroben Bedingungen kann demnach sowohl als Stressantwort gedeutet werden als auch durch den Regulator Anr bedingt sein. Da beide Kulturen, sowohl die aerobe als auch die anaerobe Kultur, in der exponentiellen Phase ( $OD_{578} = 0,5$ ) geerntet wurden, kann eine Induktion durch RpoS jedoch ausgeschlossen werden.

Allen vier Denitrifikationsgenen, Nitrat-, Nitrit-, NO- und  $N_2O$ -Reduktase, ist gemeinsam, dass sie Elektronen auf ihre Substrate übertragen. Diese Elektronenübertragung erfolgt dabei meistens über Häm b oder Häm c. Auch Cytochrome (*bc<sub>1</sub>* und *c<sub>551</sub>*), welche die Elektronen liefern, besitzen ebenfalls Häm-Gruppen. Da der Bedarf an Häm unter denitrifizierenden Bedingungen ansteigt, wird bestärkt durch die Tatsache, dass die Hämbiosynthese in *P. aeruginosa* induziert wird, wenn ein Wachstum unter denitrifizierenden Bedingungen erfolgt (Hungerer *et al.*, 1995). Die Denitrifikationsgene wie auch die Hämbiosynthesegene als Kofaktorlieferanten werden deshalb koordiniert reguliert und stehen teilweise unter der Kontrolle der gleichen Regulatoren (Rompf *et al.*, 1998).

Das Enzym Coproporphyrinogen III Oxidase, kurz HemF genannt (Protein-Nr. 23 im Gel), katalysiert in der Hämbiosynthese den Schritt von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen. HemF benötigt für die Katalyse molekularen Sauerstoff und im Falle von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass sich Mangan stimulierend auf die Aktivität des Enzyms auswirkt (Breckau *et al.*, 2003). Eine Reihe fakultativ anaerober und strikt anaerober Bakterien besitzen für diesen Schritt ein strukturell nicht verwandtes, Sauerstoff-unabhängiges Enzym, das für die Katalyse NADP<sup>+</sup> und S-Adenosylmethionin benötigt und ein Fe-S-Zentrum besitzt (Layer *et al.*, 2003). Bei diesem Enzym handelt es sich um die Coproporphyrinogen III Dehydrogenase HemN. Im Genom von *P. aeruginosa* konnten sowohl das dazugehörige Gen *hemF* als auch *hemN* annotiert werden.

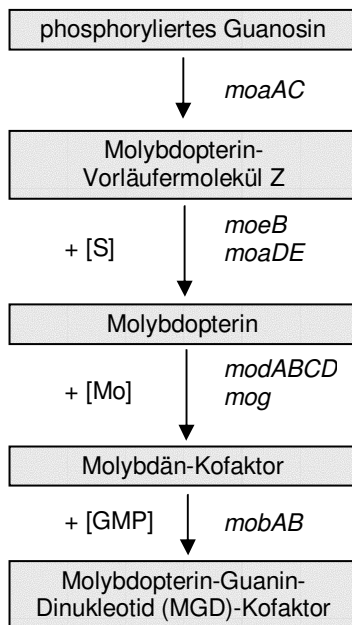
HEM13, ein *hemF*-Analogon in *Saccharomyces cerevisiae*, zeigte ebenso wie das *P. aeruginosa hemF* eine deutliche Induktion unter anaeroben Bedingungen (Zagorec *et al.*, 1988; Rompf *et al.*, 1998). Die Proteomanalysen bestätigen, dass dieses Protein in *P. aeruginosa* sowohl aerob, als auch anaerob in der Zelle vorhanden ist. Beim Vergleich beider Zustände wurde ein DE-Wert von 0,21 angegeben, dass entspricht einer 4,83-fachen Induktion unter anaeroben Bedingungen.

Eine mögliche Ursache für die Induktion des Sauerstoff-abhängigen Enzyms in *S. cerevisiae* unter anaeroben Bedingungen könnte seine Funktion während der Adaption an wechselnde Umweltbedingungen sein. Unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen wird die Synthese des Enzyms stark erhöht, um eine Umsetzung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX während des anaeroben Wachstums zu gewährleisten (Zagorec *et al.*, 1988).

Ebenso wie HEM13 in *S. cerevisiae*, besitzt *P. aeruginosa* HemF eine hohe Affinität gegenüber Sauerstoff. Ein erhöhtes Vorkommen von HemF unter anaeroben Bedingungen kann möglicherweise bedingt sein durch die Induktion des Enzyms während des Wechsels vom aeroben zum anaeroben Wachstum. Im Kontrast zu HEM13 in *S. cerevisiae* besitzt jedoch *P. aeruginosa* für anaerobe Bedingungen das Sauerstoff-unabhängige Enzym HemN.

Untersuchungen der Promotoraktivität (*hemF-lacZ*) ergaben, dass unter anaeroben Bedingungen *hemF* sowohl durch Anr, als auch durch Dnr reguliert wird (Rompf *et al.*, 1998). Unterstützt wird dieses Ergebnis durch bioinformatische Analysen, welche eine Anr-Bindestelle im Promotorbereich von *hemF* bestätigen konnten. Weiterhin wurde beschrieben, dass eine anaerobe Expression von *hemF* ebenfalls durch das Nitratsensorsystem NarXL und dem „integration host factor“ IHF induziert wird (Schobert and Jahn, 2002).

Molybdän ist eine essentielle Komponente des Molybdopterin-Guanin-Dinukleotids (MGD). Dieses wiederum kommt in vielen Molybdoenzymen vor und katalysiert Redoxreaktionen mit Elektronentransport. Die respiratorische und periplasmatische Nitratreduktase enthalten als Kofaktor ein MGD, an welchem die eigentliche Reduktion von Nitrat zu Nitrit stattfindet (Richardson, 2000).



In den ersten Schritten der MGD-Synthese von *E. coli* werden die Produkte der *moa*- und *moe*-Gene benötigt, welche über ein Vorläufermolekül das Molybdopterin bilden.

Durch das Transportsystem *modABCD* wird Molybdat in die Zelle transportiert und dann in einen Pterin-Kofaktor integriert.

Für die vollständige Aktivierung des MGD sind die beiden Proteine MobAB nötig (Zumft, 1997).

**Abb.25: Prinzipielle Schritte der MGD-Biosynthese in *E. coli* (Zumft, 1997).**

Als Protein Nr.33 konnte beim Vergleich von aeroben Wachstum mit denitrifizierenden Bedingungen (Gel Abb. 23) das Molybdopterin-Biosynthese-Protein MoaB1 identifiziert werden. Bei *P. aeruginosa* liegt das dazugehörige Gen in einem Gencluster mit den Genen *moaCDE* und *moeA*.

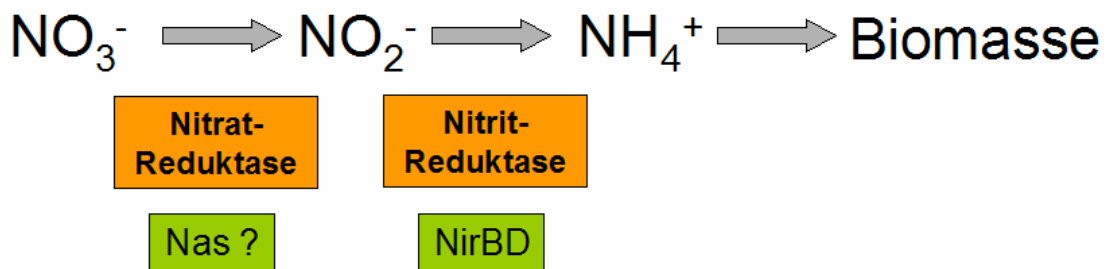
Sowohl MoaB1 (72%) als auch die Produkte der Gene *moaCDE* und *moeA* (57-70%) zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu den gleichen Genprodukten in *E. coli* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) und [www.prodoric.de](http://www.prodoric.de)). Da in *E. coli* diese Proteine nötig sind, um das Molybdopterin zu bilden (siehe Abb.25), ist es sehr wahrscheinlich, dass MoaB1 in *P. aeruginosa* ebenfalls in die Bildung von Molybdopterin involviert ist.

In Tabelle 9 zeigen die RE- Werte, dass die Bildung von MoaB1 nur unter anaeroben Bedingungen erfolgte.

Die unter denitrifizierenden Bedingungen stark exprimierte Nitratreduktase NarGHJI benötigt für die Reduktion von Nitrat zu Nitrit den Kofaktor MGD, d.h. es besteht unter diesen Bedingungen ein erhöhter Bedarf an MGD-synthetisierenden Enzymen, was eine Induktion von MoaB1 unter anaeroben Bedingungen erklären würde.

In *E. coli* konnte für Molybdän-abhängige Enzyme, am Beispiel der respiratorische und periplasmatische Nitratreduktase schon gezeigt werden, dass die Synthese von Apoenzym und Kofaktor koordiniert erfolgt. Hierbei spielt der Molybdänregulator ModE eine große Rolle (McNicholas und Gunsalus, 2002 und Hasona *et al.*, 1998).

Während bei der Denitrifikation Nitrat, zur Erzeugung eines Protonengradienten, durch die Nitrat- und Nitritreduktase zu NO und anschließend weiter zu molekularen Stickstoff reduziert wird, kann *P. aeruginosa* Nitrat auch über die assimilatorische Nitratreduktase zu Nitrit reduzieren (Jeter *et al.*, 1984).



**Abb.26: Schema der assimilatorischen Nitrat/Nitrit-Reduktion in *P. aeruginosa* und die dazugehörigen Enzyme.**

Bei der assimilatorischen Nitratreduktion wird Nitrat zunächst zu Nitrit, dann aber weiter auf die Oxidationsstufe von Ammonium reduziert und anschließend in organische Moleküle eingebaut (Abb.26). Diese Reduktionen finden im Cytoplasma statt und unterscheiden sich in Funktion und Regulation von der Nitratdissimilation, die der Energiegewinnung dient, deren Enzyme membrangebunden sind und deren Produkte ausgeschieden werden. Aufgrund von Sequenzvergleichen konnten in *P. aeruginosa* die Gene *nasA*, *nirB* und *nirD* annotiert werden. Die dazugehörigen Proteine weisen eine hohe Ähnlichkeit zu den Untereinheiten der assimilatorischen Nitritreduktase und einem Nitrattransporter in *Bacillus subtilis* auf (Tab.10). In *B. subtilis* sind die Gene der Nitrat/Nitrit-Assimilation im *nasBCDEF*-Operon und dem direkt downstream liegenden *nasA*-Gen zusammengefasst (Ogawa *et al.*, 1995).

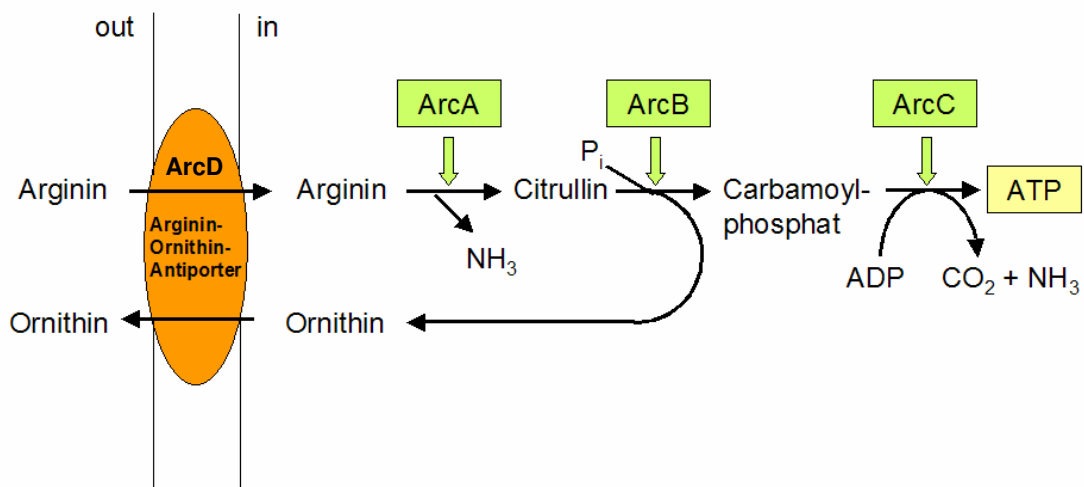
**Tab.10: Mögliche Funktion und Ähnlichkeiten der in *P. aeruginosa* vorkommenden Proteine der assimilatorischen Nitrat/Nitritreduktion ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).**

| PA   | Protein | Mögliche Funktion                       | Ähnlichkeit                         |
|------|---------|---|-------------------------------------|
| 1783 | NasA    | Nitrattransporter                       | NasA <i>Bacillus subtilis</i> (66%) |
| 1781 | NirB    | große Untereinheit der Nitritreduktase  | NasD <i>B. subtilis</i> (69%)       |
| 1780 | NirD    | kleine Untereinheit der Nitritreduktase | NasE <i>B. subtilis</i> (62%)       |

Als Protein-Nr. 6 wurde im 2D-Gel (Abb. 23) die große Untereinheit der assimilatorischen Nitritreduktase NirB identifiziert. In dazugehöriger Tabelle (Tab. 9) wird deutlich, dass NirB, ebenso wie NirS nur unter anaeroben Bedingungen synthetisiert wurde.

In *P. aeruginosa* liegen über die Expression von *nirB* noch keine detaillierten Kenntnisse vor, in *E. coli* konnte jedoch schon gezeigt werden, dass das *nirBD*-Operon durch Nitrat oder Nitrit während des anaeroben Wachstums induziert wird (Page *et al.*, 1990).

*P. aeruginosa* nutzt Arginin als C-, N-, und Energiequelle über vier verschiedene Stoffwechselwege. In Anwesenheit von Sauerstoff kann Arginin über den Arginin-Succinyltransferase-Pathway zu Glutamat und Succinat abgebaut werden, oder über den Arginin-Decarboxylase-Pathway zu Putrescin. Als weitere Möglichkeit zur Argininverwertung kann der Arginin-Dehydrogenase-Pathway genutzt werden (Haas *et al.*, 1990). Unter anaeroben Bedingungen ohne alternativen Elektronenakzeptor, wird Arginin über den Arginin-Deiminase-Pathway quantitativ zu Ornithin abgebaut, während ein Molekül ATP regeneriert wird (Abb.27). Bei der Energiegewinnung durch Arginin, muss dem Bakterium zum Wachstum ein komplexes Medium angeboten werden (Vander Wauven *et al.*, 1984).



**Abb.27: Schema der Arginin-Fermentation von *P. aeruginosa* im anaeroben Medium ohne Elektronenakzeptoren** (Abbildung modifiziert nach Winteler *et al.*, 1996). Pro Arginin-Molekül wird ein Molekül ATP gebildet. ArcA, Arginin Deiminase; ArcB, katabolische Ornithin-Carbamoyl-Transferase; ArcC, Carbamat-Kinase; ArcD, Arginin/Ornithin-Antiporter.

Das im Versuch benutzte LB-Medium ist ein komplexes Medium und enthält Spuren von Arginin. Im Proteinmuster (Abb. 23) konnten deshalb auch drei Genprodukte des ArcDABC-Operons identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die Proteine ArcA (Arginin Deiminase, Protein-Nr. 12 und 13), ArcB (Ornithin-Carbamoyl-Transferase,

Protein-Nr. 18) und ArcC (Carbamat Kinase, Protein-Nr. 20). Das Protein ArcD ist ein Transportsystem, welches den Austausch von Arginin und Ornithin katalysiert, um einen effizienten Energiestoffwechsel zu gewährleisten (Verhoogt *et al.*, 1992)

Die Proteomanalyse zeigt, dass nur das Protein ArcC unter anaeroben Bedingungen leicht induziert wird. Der DE-Wert beträgt 0,26, das entspricht einer 3,8-fachen Induktion. Die Werte für ArcB und ArcA sind in der Tabelle 12, bei den nicht regulierten Proteinen aufgeführt. Ihre DE-Werte liegen im Bereich von 1, d.h., dass keine anaerobe Induktion stattfand. Das war auch nicht zu erwarten, denn das Medium enthielt als alternativen Elektronenakzeptor Nitrat. Sowohl Nitrat als auch Nitrit verhindern eine Induktion der Enzyme der Arginin-Fermentation unter anaeroben Bedingungen (Mercenier *et al.*, 1980). Da bei der Arginin-Fermentation aus 1 mol Arginin nur 1 mol ATP gebildet wird, ist es für *P. aeruginosa* effizienter, Stoffwechselwege mit höherer Energiebilanz, z.B. die Nitratatmung, vorzuziehen.

Eine mögliche Ursache für die Induktion von ArcC könnte in einer anderen, bisher unter diesen Bedingungen noch unbekannter Funktion der Carbamatkinase liegen.

Als weiteres, am Argininstoffwechsel beteiligtes Protein, konnte AotJ identifiziert werden (Protein-Nr. 25). Das dazugehörige Gen ist Bestandteil des *aot*-Operons, bestehend aus *aotJQMOP-argR*. Die Sequenzen von *aotJQMP* kodieren die Informationen für die Komponenten eines periplasmatischen Bindeprotein-abhängigen Transporters. Transportstudien konnten zeigen, dass diese vier Proteine verantwortlich sind für den Arginin-induzierten Arginin- und Ornithintransport in *P. aeruginosa* (Nishijyo *et al.*, 1998). Die Substrate müssen zuerst an das Bindeprotein AotJ gebunden werden, bevor sie in die Zelle transportiert werden können. Bisher konnte experimentell gezeigt werden, dass Arginin, als C- und N-Quelle, das *aot*-Operon induziert, aber bei Zugabe von Succinat, einer für *P. aeruginosa* bessere C-Quelle, die Induktion aufgehoben wird. Das Signal bei der Induktion durch Arginin wird dabei durch den transkriptionellen Regulator ArgR vermittelt (Nishijyo *et al.*, 1998). Die Gene des *aot*-Operons liegen direkt stromaufwärts nach den *aru*-Genen, welche für die Enzyme des aeroben Arginin-Succinyltransferase-Pathways kodieren, und ebenfalls durch ArgR induziert werden (Nishijyo *et al.*, 1998). Bioinformatische Analysen konnten im Promotorbereich des Operons keine potentielle Bindestelle für den Regulator Anr vorhersagen.

Das Arginin-Ornithin Bindeprotein (AotJ) wurde in der Proteomanalyse nur unter anaeroben Bedingungen detektiert. Dr. M. Eschbach (2004 b) konnte in seiner Doktorarbeit ebenfalls eine Expression von AotJ nur unter anaeroben Bedingungen zeigen.

Auch von dem Eisenaufnahme-Regulator Fur (Protein-Nr.42) konnte unter denitrifizierenden Bedingungen im 2D-Gel mehr Protein nachgewiesen werden, als unter aeroben Bedingungen.

Fur ist ein weit verbreitetes, gut konserviertes, bakterielles Protein, welches eine Schlüsselfunktion bei der Regulation des Eisen-Metabolismus einnimmt. In Abhängigkeit von intrazellulärem Eisen reguliert es die Expression von Eisen-Erwerb- und Speicherungssystemen (Hassett *et al.*, 1996 b, Ochsner *et al.*, 1995, Vasil and Ochsner, 1999). Fur-Homologe wurden in einer großen Anzahl Gram-negativer Bakterien, inklusive einiger wichtiger Humanpathogenen (*Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium*, u.v.m.), gefunden. Für pathogene Bakterien ist die Eisenaufnahme ein grundsätzliches Problem, da die Bioverfügbarkeit dieses Elementes im Wirt oft sehr gering ist. Die Eisenlimitierung kann dann ein Signal für die Expression von Virulenzfaktoren sein, deren Regulation durch Fur beeinflusst wird (Ochsner *et al.*, 1995). Im Falle von *P. aeruginosa* erfolgt z.B. die maximale Produktion von ExotoxinA unter Eisen-limitierenden Bedingungen (Bjorn *et al.*, 1978). Durch den cytotoxischen Effekt von ExotoxinA wird das Wirtsgewebe zerstört und somit Eisen freigesetzt.

Bei Fur handelt es sich um ein klassisches Repressorprotein, welches für seine Aktivierung Eisen benötigt. Aktives Fur, bestehend aus zwei Monomeren mit einem gemeinsam gebundenen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion, bindet an einer bestimmte Zielsequenz (Fur-Box) im Promotorbereich von Eisen-regulierten Genen und blockiert ihre Transkription wenn eine bestimmte Menge an  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zur Verfügung steht (Neilands, 1990). Im Gegensatz zu *E. coli* (EC-Fur) benötigt Fur in *P. aeruginosa* (PA-Fur) kein strukturelles  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion für seine Bindung an die DNA (Lewin *et al.*, 2002). Unter Eisen-limitierenden Bedingungen wird die Bindung von Fur aufgehoben und die entsprechenden Gene können transkribiert werden.

Es konnten eine Reihe von Fur-regulierten Genen, den sogenannten „pigs“ („*Pseudomonas iron-regulated genes*“) in *P. aeruginosa* identifiziert werden. PA-Fur fungiert dabei teilweise als globaler Regulator, welcher die Expression anderer regulatorischer Gene kontrolliert und somit einen nur indirekten Einfluss auf Eisen-regulierte Gene ausübt (Ochsner *et al.*, 1995).

Eine große Gruppe dieser Gene ist involviert in der Siderophoren-bedingten Aufnahme von Eisen. Unter Eisenmangel produziert *P. aeruginosa* zwei Siderophore, Pyochelin und Pyoverdin. Spezifische Rezeptoren in der äußeren Membran binden diese mit Eisen beladenen Siderophore und schleusen die Ionen ins Cytoplasma (Escolar *et al.*, 1999). Nur die Gene der Pyochelin-Biosynthese stehen unter direkter Kontrolle von Fur, die Gene der Pyoverdin-Synthese werden durch den Fur-kontrollierten alternativen Sigmafaktor PvdS kontrolliert (Vasil und Ochsner, 1999). Ebenso wie die



Biosynthesegene und Regulatorgene der Siderophoren stehen auch die Gene ihrer Rezeptoren unter Fur-Kontrolle (Vasil und Ochsner, 1999).

Auch die Synthesegene von ExotoxinA und der Endoprotease PrpL (Virulenzfaktoren) werden in *P. aeruginosa* über den Fur-kontrollierten alternativen Sigmafaktor PvdS reguliert (Vasil und Ochsner, 1999; Ochsner *et al.*, 1995). Die alternative Eisenaufnahme über Häm-Aufnahme-Systeme (*phu* und *has*) wird in *P. aeruginosa* ebenfalls über Fur reguliert (Vasil und Ochsner, 1999).

Untersuchungen von Hassett *et al.* (1996 b) zeigten, dass die Expression der Mn-abhängigen Superoxid-Dismutase (MnSOD) in *P. aeruginosa* von Fur reprimiert wird, die Expression der Fe-anhängige SOD allerdings positiv beeinflusst wird, ebenso wie bei der Katalase KatA und den Bakterioferritinen BfrA und BfrB. Allerdings wird hier eine indirekte Regulation durch Fur vermutet.

2002 wurde von Massé und Gottesman in *E. coli* eine regulatorische kleine RNA (sRNA) beschrieben, welche durch die Expression von Fur reprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die negative Regulation von Genen durch RyhB (Bezeichnung der sRNA) für die positive Regulation dieser Gene durch Fur verantwortlich ist. In *P. aeruginosa* konnten ebenfalls zwei sRNAs, PrrF1 und PrrF2, identifiziert werden, deren Expression unter Eisen-limitierenden Bedingungen induziert wurde (Wilderman *et al.*, 2004). Das Entfernen beider sRNAs zeigte wie in *E. coli* einen Effekt auf die Eisen-abhängige Regulation von Genen, welche in die Speicherung von Eisen (Bakterioferritine), in die Abwehr von oxidativen Stress (Superoxid-Dismutase FeSOD) und in den intermediären Metabolismus (Succinat-Dehydrogenase) involviert sind (Wilderman *et al.*, 2004).

Das bedeutet, dass unter Fe-Mangel- Bedingungen Fur inaktiv ist und dadurch die sRNA die Bildung von Eisenspeicherproteinen induzieren kann.

Da unter denitrifizierenden Bedingungen die 2,67-fache (DE 0,38) Menge an Fur nachgewiesen werden konnte, lässt vermuten, dass unter aeroben Bedingungen Eisenmangel herrscht und in den anaeroben Kulturen ausreichend Eisen vorhanden ist.

Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen besitzen Proteine, mit denen sie aufgenommenes Eisen speichern können, die Ferritine. Hierbei handelt es sich Proteine, bestehend aus 24 Untereinheiten, welche eine zentrale „Höhle“ umgeben (Spiro *et al.*, 1999). In diesem Ferritin-„Haus“ können bis zu 4500 Eisenatome gespeichert werden, oder die 200-fache Menge an Eisen im Vergleich zum Eisengehalt in Hämoglobin. Dieses gespeicherte Eisen ist nicht Häm-gebunden, sondern liegt als inertes Mineral (Eisenhydrit oder Eisen-Oxy-Hydroxid-Phosphat) vor, welches zu jeder Zeit verfügbar ist (Harrison und Treffry, 1999). In Bakterien gibt es mindestens zwei verschiedene Formen von Ferritinen: bakterielles Ferritin (Fnt), welches dem tierischen Ferritin sehr ähnlich ist und

Bakterioferritin (Bfr), welches als nicht-Häm-Eisen-Ferritin, dennoch Häm-Gruppen enthält (Spiro *et al.*, 1999; Laulhere *et al.*, 1992).

*P. aeruginosa* besitzt zwei Bakterioferritine, BfrA (auch als Cytochrom *b<sub>1</sub>* oder *b<sub>557</sub>* bekannt) und BfrB. Die Gene beider Proteine sind in unterschiedlichen Genloci lokalisiert und werden unabhängig voneinander exprimiert.

In Abwesenheit der regulatorischen small RNAs wird BfrB (Protein-Nr. 38) durch den Regulator Fur und Verfügbarkeit von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen positiv reguliert (Wilderman *et al.*, 2004). Bedingt durch die anaerobe Induktion von Fur (s. oben) kann auf ein Fehlen dieser sRNAs geschlossen werden. Das wiederum impliziert, dass unter anaeroben Bedingungen kein Eisenmangel herrscht. Die Tatsache, dass BfrB als Fe-Speicherprotein unter anaeroben Wachstumsbedingungen im 2D-Gel 2,78-fach induziert (DE 0,36) vorliegt, bestätigt den Sachverhalt.

Das wohl wichtigste Eisen speichernde Protein in *P. aeruginosa* ist BfrA (Protein-Nr. 37). Es besteht aus 24 Untereinheiten mit 3 - 9 in vivo gebundenen Hämgruppen (Kadir *et al.*, 1990) und kann bis zu 700 Fe-Atome speichern (Moore *et al.*, 1994). Dieses Protein codierende Gen liegt direkt stromaufwärts von *katA*. Das Genprodukt von *katA* ist eine von drei in *P. aeruginosa* vorhandenen Katalasen, welche die höchste Aktivität beim Entfernen von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zeigt. Auch dieses Protein KatA konnte im 2D-Gel (Abb. 23) detektiert und identifiziert werden (Protein-Nr. 4 und 5). Untersuchungen mit *P. aeruginosa* haben gezeigt, dass BfrA, aber nicht BfrB, für eine optimale Katalaseaktivität notwendig ist (Ma *et al.*, 1999). Ohne dieses Bakterioferritin wird die Aktivität von KatA um 50% reduziert und die Sensitivität gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  erhöht. Da die Katalase für ihre Aktivität Häm-Gruppen benötigt, vermuten Ma *et al.* (1999), dass vielleicht BfrA die Eisen-Ionen spendet, welche im letzten Schritt der Hämbiosynthese von der Ferrochelatase benötigt werden. Die Gene beider Proteine, BfrA und KatA, besitzen eigene Promotoren, welche sowohl von  $\text{Fe}^{2+}$ , als auch direkt bzw. indirekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  abhängig sind (Ma *et al.*, 1999). Das beide Gene unabhängig voneinander exprimiert werden, wird auch im Proteinmuster deutlich. Die Katalase zeigt unter anaeroben Bedingungen, im Gegensatz zu BfrA, keine Induktion (Tab.12).

Die nur unter anaeroben Bedingungen stattfindende Bildung des Eisenspeicherproteins BfrA (Tab.9) spiegelt auch hier die ausreichende Verfügbarkeit an Eisen im anaeroben Ansatz wieder. Bioinformatische Untersuchungen des *bfrA*-Promotors konnten eine potentielle Anr-Bindestelle nachweisen, was den Befund einer Induktion unter anaeroben Bedingungen untermauert.

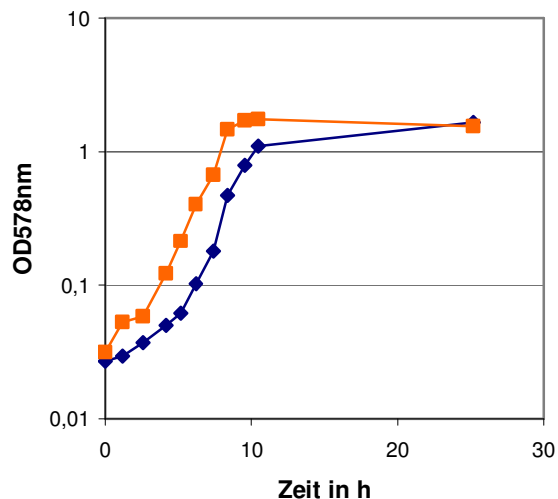
Ein ebenfalls bei Sauerstoffstress detoxifizierendes Enzym ist die Superoxid-Dismutase (SOD). Zwei Moleküle Superoxid werden von ihr in Gegenwart von Protonen zu  $\text{H}_2\text{O}_2$

und Sauerstoff abgebaut. Um das entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu entsorgen, arbeiten die Superoxid-Dismutasen meist mit Katalasen zusammen. Im 2D-Gel als Protein Nr. 36 bezeichnet, konnte die SodB von *P. aeruginosa* identifiziert werden, welche als Kofaktor Eisen verwendet. Die zweite in *P. aeruginosa* vorkommende Superoxid-Dismutase ist die SodA. Diese trägt als Kofaktor Mangan.

Ebenso wie BfrA und BfrB wird auch die FeSOD bei ausreichender Eisenverfügbarkeit induziert. Im Gegensatz dazu erfolgt die Synthese der MnSOD nur unter Eisen-limitierenden Bedingungen (Vasil und Ochsner, 1999). Die RE- und DE-Werte von SodB (Tab.9) zeigen, dass anaerob eine 2,36-fache Induktion vorliegt (DE 0,42).

Die Ergebnisse der Proteomanalyse, speziell die Induktion der Proteine Fur, BfrA, BfrB und SodB lassen vermuten, dass unter anaeroben Bedingungen zum Zeitpunkt der Zellernte (logarithmische Phase) kein Mangel an verfügbarem Eisen besteht.

Wachstumskurven von *P. aeruginosa*, aufgenommen unter anaeroben Bedingungen in LB mit Nitrat als Elektronenakzeptor und zusätzlicher  $\text{Fe}^{2+}$ -Zugabe (7 mg/l) zeigten in der logarithmischen Phase keinen Unterschied zum Wachstum ohne zusätzliches Eisen. Die Generationszeiten von *P. aeruginosa* betrugen im LB-Medium 71,2 min, im Medium mit Eisen 72,6 min (Abb.28). Das bestätigt die Hypothese, dass unter anaeroben Bedingungen zum Zeitpunkt der Zellernte (logarithmische Phase) kein Eisenmangel vorliegt.



**Abb.28: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit 50 mM Nitrat, mit ( —■— ) und ohne ( —■— ) 7 mg/ml  $\text{FeSO}_4$ .**

Auf Grund der verlängerten lag-Phase der Kultur ohne zusätzliche Eisenzugabe (Abb. 28, blauer Graph) wird deutlich, dass dieses Metall dennoch unter anaeroben Bedingungen einen positiven Einfluß auf das Wachstum von *P. aeruginosa* ausübt.

Im Kontrast zu den Ergebnissen der Proteomanalyse und der Wachstumskurven, welche zeigen, dass im Vergleich zu aeroben Bedingungen unter denitrifizierenden Bedingungen kein Mangel an verfügbaren Eisen besteht, steht die Tatsache, dass *P. aeruginosa* während des anaeroben Wachstums vermehrt Fe-S-Proteine bildet und als Anpassung an einen veränderten Energiemetabolismus die Hämbiosynthese, und damit den Eisenverbrauch, signifikant steigert (Schobert and Jahn, 2002).

Die Alkohol-Dehydrogenase (AdhA) aus *P. aeruginosa*, die eine 73 %ige Sequenzidentität mit der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Alkohol Dehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* besitzt, ist unter denitrifizierenden Bedingungen 18,87-fach induziert (DE 0,05). Das Protein ist im 2D-Gel (Abb.23) durch die Nummer 19 gekennzeichnet. Die Promotorsequenz des zugehörigen *adhA*-Gens weist eine Anr-Bindestelle mit hoher Identität (87%) zur Anr-Konsensussequenz auf. Dies unterstützt die Vermutung, dass dieses Gen unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird. Alkohol-Dehydrogenasen katalysieren die Oxidation eines Alkohols zum Aldehyd. Dabei werden zwei Wasserstoffatome abgespalten, von denen eins auf NAD<sup>+</sup> übertragen wird, so dass neben dem Aldehyd noch NADH und ein H<sup>+</sup> entstehen. NADH wiederum kann von der NADH-Dehydrogenase genutzt werden, um Elektronen auf die Nitratreduktase zu übertragen. Da dem Medium jedoch kein Alkohol zugesetzt wurde und während der Denitrifikation auch kein Alkohol als Fermentationsprodukt gebildet wird (Eschbach, 2004 b), bleibt eine Induktion dieses Proteins unerklärt.

Das OprE von *P. aeruginosa* ist ein Protein der äußeren Membran, welches Kanäle mit ziemlich kleiner Porengröße formt. Seine physiologische Funktion ist bis jetzt noch unbekannt, denn OprE-Mutanten zeigen keinen Wachstumsphänotyp und keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit von Antibiotika (Yoneyama *et al.*, 1995). Unter anaeroben Bedingungen erfolgt eine erhöhte Expression des dazugehörigen Gens (Yamano *et al.*, 1998). Auch in diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass OprE unter anaeroben, bzw. denitrifizierenden Bedingungen induziert wird. Dieses Protein konnte im Gel an vier verschiedenen Positionen (Protein-Nr. 14 - 17) mit vier verschiedenen DE-Werten detektiert werden. Erläuterungen zu diesen sogenannten multiplen Spots sind in Kapitel 3.1.2.4 zu finden. Alle vier Spots sind unter anaeroben Bedingungen stärker vorhanden als unter aeroben. Die DE-Werte erstrecken sich von 0,83 (1,2-fach) bis 0,04 (23,26-fach). Die geringe 1,2-fache Induktion von Protein-Nr. 16 fällt in den bereits erläuterten Schwankungsbereich, in welchem ein Spot als nicht mehr signifikant verschieden eingeordnet wird. Er wurde somit in die Tabelle 12 der nicht regulierten Proteine eingereiht. In folgender Tabelle sind die RE- und DE-Werte der einzelnen Proteine

zusammengefasst. Anhand der Summe der RE-Werte wird deutlich, dass unter anaeroben Bedingungen die Proteinsynthese von OprE signifikant erhöht ist.

**Tab.10a: RE-Werte (relative Proteinmengen) und DE-Werte (Induktionsfaktoren) des an verschiedenen Stellen im 2D-Gel nachgewiesenen Proteins OprE.** Die Protein-Nr. gibt die Lage des jeweiligen Proteins im 2D-Gel (Abb.23) an.

| Protein-Nr. | Protein | RE anaerob   | RE aerob    | DE   |
|-------------|---------|--------------|-------------|------|
| 14          | OprE    | 1163         | 63          | 0,04 |
| 15          | OprE    | 2654         | 928         | 0,28 |
| 16          | OprE    | 2926         | 2784        | 0,83 |
| 17          | OprE    | 5506         | 1750        | 0,25 |
| Summe:      |         | <b>12249</b> | <b>5525</b> |      |

Bioinformatische Untersuchungen des Promotorbereiches konnten keine potentielle Anr-Bindestelle erkennen, jedoch haben Untersuchungen von Yamano *et al.* (1998) ergeben, dass der alternative Sigmafaktor RpoN, neben anderen, bis jetzt noch unbekannten regulatorischen Proteinen, an der Regulation beteiligt ist. *P. aeruginosa* RpoN kontrolliert die Expression diverser Gene, welche an der Assimilation und Degradation von Stickstoffkomponenten beteiligt sind, sowie an der Beweglichkeit und Anhaftung der Zellen (Totten *et al.*, 1990).

### 3.1.3.2 Gruppe 2: Aerob induzierte Proteine bei Wachstum auf Vollmedium mit Nitrat

Neben einer Reihe von anaerob induzierten Proteinen gab es auch wenige, welche aerob induziert waren. In folgender Tabelle (Tab.11) sind die identifizierten Proteine zusammengefasst.

**Tab.11: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps in LB-Medium im Vergleich zu anaeroben Bedingungen unter aeroben Bedingungen induziert wurden.** Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb. 23), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein |                                      | pI theor. | Mw theor. | RE anaerob | RE aerob | DE   |
|----|------|---------|--------------------------------------|-----------|-----------|------------|----------|------|
| 8  | 5554 | AtpD    | ATP -Synthase beta chain             | 4,73      | 49,48     | 4319       | 21160    | 3,88 |
| 9  |      | AtpD    |                                      |           |           | 2693       | 11107    | 3,26 |
| 10 | 5556 | AtpA    | ATP-Synthase alpha chain             | 5,11      | 55,37     | 3398       | 15884    | 3,7  |
| 21 | 3655 | Tsf     | Elongationsfaktor Ts                 | 5,01      | 30,63     | 2180       | 12665    | 4,6  |
| 24 | 4352 |         | Konserviertes hypothetisches Protein | 5,83      | 30,95     | 379        | 1004     | 2,09 |
| 30 | 4671 | Rply    | probl. ribosomales Protein L25       | 5,76      | 21,94     | 7262       | 18618    | 2,03 |

Das Operon *atpBEFHAGDC* in *P. aeruginosa* codiert Gene für die ATP-Synthase. Der Proteinkomplex setzt sich aus zwei Teilen zusammen, einem membranständigen Teil, die  $F_0$ -Domäne, und einem hydrophilen, ins Cytoplasma weisenden Teil, die  $F_1$ -Domäne. Beide sind über einen statischen Stiel miteinander verbunden. Die  $F_0$ -Domäne besteht aus drei Proteinen ABC (AtpBFE), welche in einem  $AB_2C_{12}$ -Komplex angeordnet sind. Die  $F_1$ -Domäne hingegen besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten (AtpADGHC), welche mit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  bezeichnet werden und einen  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ -Komplex bilden. Dieser ist der katalytische Teil der ATP-Synthase, welcher ATP aus ADP und  $P_i$  generiert. Der dafür nötige Protonenfluss vollzieht sich über die  $F_0$ -Domäne (Madigan *et al.*, 2003).

Durch das Vorhandensein von  $\alpha$  (AtpA, Protein-Nr. 10) und  $\beta$  (AtpD, Protein-Nr. 8 und 9) im Cytoplasma, konnten diese beiden Proteine, im Gegensatz zu den membrangebundenen Untereinheiten, im 2D-Gel aufgetrennt und identifiziert werden. Da der Zelle mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor mehr freie Energie zur Verfügung steht als bei der Verwendung anderer Akzeptoren (z.B. Nitrat) mit geringerem Redoxpotential, wird möglicherweise das Enzym, welches diese Energie bildet, unter aeroben Bedingungen auch stärker exprimiert als unter anaeroben Bedingungen. Die DE-Werte beider Proteine zeigen eine 3,2-facher bis 3,8-facher Induktion während des aeroben Stoffwechsels.

Ein weiteres, unter aeroben Bedingungen hochreguliertes, Protein ist Tsf (Protein-Nr. 21). Der DE-Wert beträgt 4,6. Neben EF-Tu und EF-G ist EF-Ts (Tsf) einer von drei bekannten Elongationsfaktoren, welche für die Anfügung von Aminosäuren an die wachsende Polypeptidkette benötigt werden. Etwa 5% des gesamten löslichen Proteins einer Bakterienzelle besteht aus EF-Tu. EF-Ts ist hierbei für die Regeneration von EF-Tu notwendig. Wie in der Wachstumskurve (Abb.22) von *P. aeruginosa* deutlich wurde, erfolgte aerob eine schnellere Zellteilung als anaerob. Bedingt durch dieses schnellere Wachstum ist ebenfalls eine höhere Proteinbiosyntheserate nötig und demnach werden unter diesen Bedingungen auch mehr Elongationsfaktoren gebildet.

In der Tabelle 11 sind zwei weitere hypothetische Proteine zu finden, deren Funktionen bis jetzt noch nicht geklärt wurden: PA4352 und PA4671.

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit, konnte Nelli Bös zeigen, dass die Expression von PA4352 Anr-abhängig ist, und während der Pyruvatfermentation induziert wird. Desweiteren konnten an Hand von Sequenzanalysen zwei USP-Domänen identifiziert werden, die das Protein in die Familie der universellen Stressproteine („universal stress proteins“, USP) einordnet.

### 3.1.3.3 Gruppe 3: Proteine, deren Bildung durch den Sauerstoffpartialdruck nicht reguliert wird

Neben einer Reihe von induzierten, bzw. reprimierten Proteinen wurden auch einige unregulierte Proteine identifiziert, welche in folgender Tabelle (Tab.12) zusammengefasst wurden.

Einige von diesen Proteinen wurden schon im Zusammenhang mit induzierten Proteinen diskutiert und werden deshalb nicht nochmal angesprochen. Dazu gehören die Katalase, die Proteine der Arginin-Fermentation (ArcAB) und das hypothetische Protein TsaA. Eines der vier als Oberflächenprotein OprE identifizierten Proteine wurde auf Grund seiner nicht signifikanten Induktion unter anaeroben Bedingungen (DE: 0,83) ebenfalls in die Tabelle der unregulierten Proteine eingeordnet.

Ein weiteres hypothetisches Protein, welches unter den getesteten Bedingungen nicht induziert wird, ist PA4907 (Protein-Nr. 26).

**Tab.12: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps in LB-Medium sowohl unter anaeroben Bedingungen (mit Nitrat) als auch unter aeroben Bedingungen gleich stark synthetisiert wurden.** Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb. 23), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein |  | pl theor. | Mw theor. | RE anaerob | RE aerob | DE   |
|----|------|---------|--|-----------|-----------|------------|----------|------|
| 4  | 4236 | KatA    | Katalase                                   | 6,21      | 55,56     | 972        | 1451     | 1,18 |
| 5  |      | KatA    |  |           |           | 2789       | 2430     | 0,69 |
| 11 | 1586 | SucB    | Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (UE)   | 5,2       | 42,86     | 3654       | 6702     | 1,45 |
| 12 | 5171 | ArcA    | Arginin-Deiminase                          | 5,37      | 46,41     | 575        | 879      | 1,21 |
| 13 |      | ArcA    |  |           |           | 1285       | 1727     | 1,06 |
| 16 | 0291 | OprE    | anaerob induz. Porin der äußeren Membran   | 8,93      | 49,64     | 2926       | 2784     | 0,83 |
| 18 | 5172 | ArcB    | katabolische Ornithin-Carbomyltransferase  | 6,12      | 38,09     | 1221       | 2542     | 1,65 |
| 26 | 4907 | YdfG    | mögliche kurze Kette einer Dehydrogenase   | 5,07      | 27,36     | 1834       | 2360     | 1,02 |
| 27 | 4031 | Ppa     | anorganische Pyrophosphatase               | 4,78      | 19,38     | 4856       | 6251     | 1,02 |
| 29 | 3529 | TsaA    | mögliche Peroxidase                        | 5,22      | 21,8      | 10178      | 15769    | 1,23 |
| 34 | 4275 | NusG    | Transkription Antitermination Protein NusG | 5,64      | 20,11     | 3742       | 3576     | 0,76 |
| 39 | 0973 | OprL    | Protein der äußeren Membran OprL           | 5,9       | 17,9      | 10466      | 13408    | 1,01 |

Die Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (SucB, Protein-Nr. 11) ist eine von zwei Komponenten des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes, welcher durch die Gene *sucA* und *sucB* codiert wird. Beide Gene bilden ein Operon und gehören zu einem Cluster, bestehend aus 10 Genen des Citratsäurecyclus.

Das Protein Ppa (Protein-Nr. 27), die anorganische Pyrophosphatase, ist ein ubiquitär in der Natur vorkommendes Enzym, welches eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus und bei biosynthetischen Reaktionen, z.B. Protein-, RNA- und DNA-Synthese, spielt. Dabei ist Ppa verantwortlich für die Hydrolyse von Pyrophosphat (PPi), welches als Produkt bei vielen biosynthetischen, ATP verbrauchenden Reaktionen anfällt.

Erkenntnisse über den Transkription-Terminationsfaktor NusG in *P. aeruginosa* stammen von Homologievergleichen mit NusG von *E. coli*, zu welchen eine 85%-ige Ähnlichkeit besteht. In *E. coli* unterstützt NusG die transkriptionelle Antitermination durch das N-Protein des Phagen Lambda, wobei es direkt und selektiv an der Terminationsfaktor *rho* bindet (Li *et al.*, 1993). Die Antitermination wird als Mechanismus der Gen-Regulation in Bakterien und Viren genutzt.

Unter den getesteten Bedingungen ebenfalls unreguliert, ist das Protein OprL (Protein-Nr. 39). Hierbei handelt es sich um ein Lipoprotein, welches sich auf der Innenseite der äußeren Membran bei vielen Gram-negativen Bakterien befindet und eine Verbindung zwischen der äußeren Membran und der Peptidoglukanschicht herstellt.

### **3.1.3.4 Vergleich experimentell ermittelter pI- und Molekulargewichte (Mw) mit theoretisch errechneten Werten**

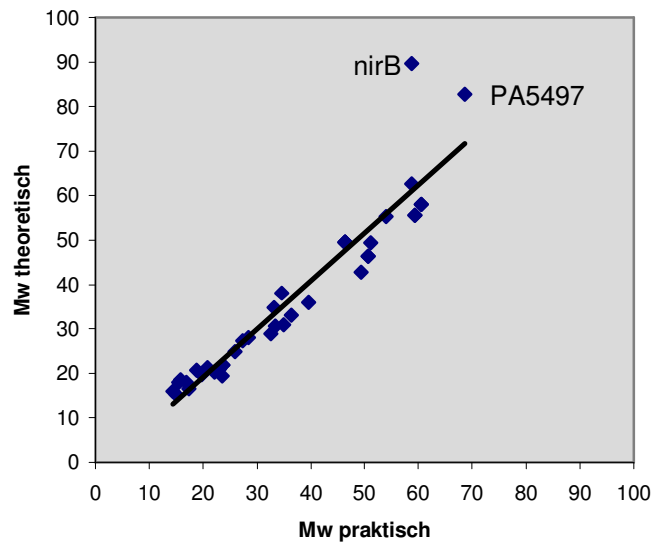
Durch den Vergleich von theoretischen und praktischen pI- und Mr-Werten kann überprüft werden, in wie weit die theoretischen Werte mit den praktischen übereinstimmen. Dazu wurden von allen bekannten Proteinen mittels Lineal die Koordinaten in einem Gel bestimmt. Mit Hilfe der Gelgröße (155 x 190) und der pI-Spanne (pH 5 - 8) konnten dann die praktischen Werte errechnet werden. Das dazu verwendete Programm JVirGel wurde von Karsten Hiller (Abtlg. Bioinformatik) entwickelt und veröffentlicht (Hiller *et al.*, 2003). Die Ergebnisse dieser Kalkulationen sind in Tabelle 13 zusammengefasst.



**Tab.13: Theoretische und praktisch ermittelte pI-Werte und Molekulargewichte der im 2D-Gel (Abb. 23) identifizierten Proteine.** Die Bestimmung erfolgte mit dem Programm JVirGel. Es wurden zu jedem Protein die PA-Nummer, das dazugehörige Gen, die xy-Koordinaten im Gel und die praktischen (prakt.) und theoretischen (theor.) Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben.

| PA   | Gen          |  | X in mm | Y in mm |  | pI<br>(prakt.) | pI<br>(theor.) |  | MW<br>(prakt.) | MW<br>(theor.) |
|------|--------------|--|---------|---------|--|----------------|----------------|--|----------------|----------------|
| 5427 | <i>adhA</i>  |  | 58      | 85      |  | 5,81           | 5,48           |  | 39,56          | 35,89          |
| 0888 | <i>aotJ</i>  |  | 41      | 118,5   |  | 5,43           | 6,75           |  | 28,37          | 27,99          |
| 5171 | <i>arcA</i>  |  | 53      | 60      |  | 5,70           | 5,37           |  | 50,70          | 46,41          |
| 5171 | <i>arcA</i>  |  | 45      | 60      |  | 5,52           | 5,37           |  | 50,70          | 46,41          |
| 5172 | <i>arcB</i>  |  | 99,9    | 98,5    |  | 6,73           | 6,12           |  | 34,60          | 38,09          |
| 5173 | <i>arcC</i>  |  | 33      | 93,5    |  | 5,26           | 5,02           |  | 36,36          | 33,06          |
| 5556 | <i>atpA</i>  |  | 35      | 53,5    |  | 5,30           | 5,11           |  | 54,08          | 55,37          |
| 5554 | <i>atpD</i>  |  | 13      | 59      |  | 4,82           | 4,73           |  | 51,21          | 49,48          |
| 5554 | <i>atpD</i>  |  | 10,5    | 69      |  | 4,76           | 4,73           |  | 46,37          | 49,48          |
| 4922 | <i>azu</i>   |  | 67      | 187     |  | 6,01           | 6,49           |  | 14,37          | 15,99          |
| 4235 | <i>bfrA</i>  |  | 17      | 179,5   |  | 4,91           | 4,8            |  | 15,48          | 17,92          |
| 3531 | <i>bfrB</i>  |  | 25      | 177,5   |  | 5,08           | 4,82           |  | 15,79          | 18,53          |
| 4764 | <i>fur</i>   |  | 76,5    | 183     |  | 6,22           | 5,54           |  | 14,95          | 15,21          |
| 0024 | <i>hemF</i>  |  | 59      | 103     |  | 5,83           | 5,49           |  | 33,09          | 34,75          |
| 4236 | <i>katA</i>  |  | 105     | 44      |  | 6,84           | 6,21           |  | 59,43          | 55,56          |
| 4236 | <i>katA</i>  |  | 99,5    | 44      |  | 6,72           | 6,21           |  | 59,43          | 55,56          |
| 3915 | <i>moaB1</i> |  | 105     | 155     |  | 6,84           | 6,49           |  | 19,75          | 19,65          |
| 3874 | <i>narH</i>  |  | 82      | 42      |  | 6,34           | 5,71           |  | 60,62          | 58,08          |
| 3874 | <i>narH</i>  |  | 75      | 42      |  | 6,18           | 5,71           |  | 60,62          | 58,08          |
| 1781 | <i>nirB</i>  |  | 132     | 45      |  | 7,44           | 6,32           |  | 58,84          | 89,67          |
| 0520 | <i>nirQ</i>  |  | 28,5    | 104,5   |  | 5,16           | 5,13           |  | 32,60          | 28,88          |
| 0519 | <i>nirS</i>  |  | 144     | 45      |  | 7,70           | 8,26           |  | 58,84          | 62,63          |
| 4275 | <i>nusG</i>  |  | 73,5    | 154     |  | 6,15           | 5,64           |  | 19,94          | 20,11          |
| 0291 | <i>oprE</i>  |  | 107,5   | 69      |  | 6,90           | 8,93           |  | 46,37          | 49,64          |
| 0291 | <i>oprE</i>  |  | 59,5    | 69      |  | 5,84           | 8,93           |  | 46,37          | 49,64          |
| 0291 | <i>oprE</i>  |  | 90      | 69      |  | 6,51           | 8,93           |  | 46,37          | 49,64          |
| 0973 | <i>oprL</i>  |  | 46      | 171     |  | 5,54           | 5,9            |  | 16,85          | 17,9           |
| 1550 | PA1550       |  | 33,5    | 143,5   |  | 5,27           | 5,14           |  | 22,13          | 20,32          |
| 1677 | PA1677       |  | 90      | 139,5   |  | 6,51           | 6,05           |  | 23,03          | 21,01          |
| 3309 | PA3309       |  | 52,5    | 168     |  | 5,69           | 5,31           |  | 17,36          | 16,48          |
| 4352 | PA4352       |  | 84,5    | 97,5    |  | 6,39           | 5,83           |  | 34,94          | 30,95          |
| 5496 | PA5496       |  | 89,5    | 127,5   |  | 6,50           | 5,96           |  | 25,94          | 24,86          |
| 5497 | PA5497       |  | 54,5    | 29,5    |  | 5,73           | 5,67           |  | 68,63          | 82,71          |
| 4031 | <i>ppa</i>   |  | 19      | 137,5   |  | 4,95           | 4,78           |  | 23,49          | 19,38          |
| 4366 | <i>sodB</i>  |  | 29,5    | 150     |  | 5,18           | 5,12           |  | 20,75          | 21,33          |
| 1586 | <i>sucB</i>  |  | 34,5    | 62,5    |  | 5,29           | 5,2            |  | 49,46          | 42,86          |
| 3529 | <i>tsaA</i>  |  | 43,5    | 137     |  | 5,49           | 5,22           |  | 23,61          | 21,8           |
| 3529 | <i>tsaA</i>  |  | 31      | 137     |  | 5,21           | 5,22           |  | 23,61          | 21,8           |
| 3655 | <i>tsf</i>   |  | 26,5    | 102     |  | 5,11           | 5,01           |  | 33,42          | 30,63          |
| 423  | <i>ycel</i>  |  | 54      | 160     |  | 5,72           | 6,08           |  | 18,79          | 20,76          |
| 4907 | <i>ydfG</i>  |  | 32      | 122,5   |  | 5,24           | 5,07           |  | 27,26          | 27,36          |

Wenn man den theoretischen und praktischen Wert des Molekulargewichtes eines Proteins in einem Digramm vergleicht, wird deutlich, dass beide Werte gut miteinander korrelieren (siehe Abb.29).



**Abb.29: Vergleich theoretischer und praktisch ermittelter Molekulargewichte von Proteinen aus *P. aeruginosa*, welche im 2D-Gel (Abb. 23) identifiziert wurden.** Zur Berechnung der theoretischen und praktischen Werte wurde das Programm JVirGel benutzt. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,8995.

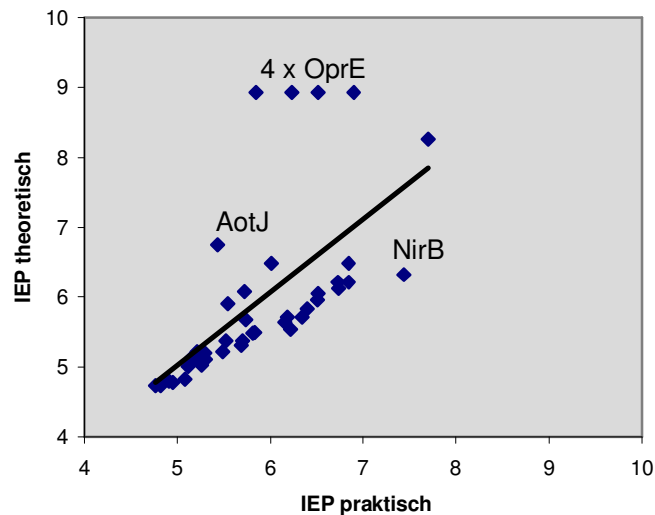
Die Ausnahmen sind die Proteine NirB und PA5497 (s. Diagramm Abb.29). Entfernt man die Daten beider Proteine aus dem Diagramm, verbessert sich der Korrelationskoeffizient von 0,8995 auf 0,9671.

Bei beiden Proteinen ist der praktisch ermittelte Wert für das Molekulargewicht kleiner als der theoretisch errechnete Wert. Das bedeutet, dass es sich bei denen im 2-D Gel aufgetrennten Proteine um kürzere Proteine handeln muss. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine proteolytische Spaltung sein. Eine weitere mögliche Ursache für die Unterschiede zwischen theoretischen und praktisch ermittelten pI- und Mr-Werten, kann an einer falschen Annotation der Gene im Genom liegen.

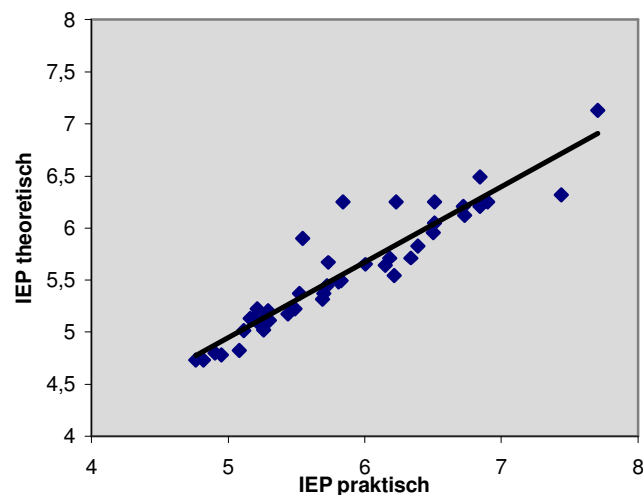
Beide Möglichkeiten, proteolytische Spaltung und falsche Annotation, können sich ebenso auf die isoelektrischen Punkte auswirken. Tatsächlich unterscheiden sich die pI-Werte von NirB ebenfalls deutlich voneinander (theor.: 6,32; prakt.: 7,44). Das legt die Vermutung nahe, dass durch Abspaltung einer bestimmten Anzahl von Aminosäuren, sowohl das Molekulargewicht, als auch der pI-Wert verändert wurde. Das hypothetische Protein PA5497 zeigt jedoch keinen deutlichen Unterschied zwischen den pI-Werten (Theorie: 5,67; Praxis: 5,73), aber praktisch eine Abnahme im Molekulargewicht von 17%. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei der Abspaltung einer bestimmten Anzahl von Aminosäuren das Verhältnis positiv geladener zu negativ geladenen Aminosäuren nicht verändert wurde. Die Abspaltung einzelner Aminosäuren, sowohl vom N-, als auch vom C-Terminus, ergaben nach der erneuten Kalkulation der pI- und Molekulargewichtswerte

bei beiden Proteinen keine Übereinstimmung zwischen praktischen Molekulargewicht und pI-Wert. Dass dies auch nicht unbedingt zu erwarten war, zeigt der Vergleich der theoretischen und praktischen pI-Werte.

Beim Vergleich von praktischen mit errechneten pI-Werten traten deutlich höhere Schwankungen auf (siehe Abb.30) als beim Molekulargewicht. Der Korrelationskoeffizient beträgt nur 0,4066.



**Abb.30: Vergleich theoretischer und praktisch ermittelter pI-Werte (IEP) von Proteinen aus *P. aeruginosa*, welche im 2D-Gel (Abb.23) identifiziert wurden.** Zur Berechnung der theoretischen und praktischen Werte wurde das Programm JVirGel benutzt. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,4066.



**Abb.31: Vergleich theoretischer und praktischer pI-Werte, unter Berücksichtigung möglicher Abspaltungen von Signalsequenzen, von Proteinen aus *P. aeruginosa*, welche im 2D-Gel (Abb. 23) identifiziert wurden.** Zur Berechnung der theoretischen und praktischen Werte wurde das Programm JVirGel benutzt. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,8737.

Zu den stark abweichenden Proteinen gehören AotJ, NirB und OprE. Zuletzt genanntes Protein wurde im Gel an vier verschiedenen Stellen nachgewiesen, wobei sich das Molekulargewicht nicht nachweisbar veränderte (Abb.23, Protein-Nr. 14-17). Solche multiplen Spots konnten auch bei NarH, KatA, TsA, AtpD und ArcA beobachtet werden. Bei den eben genannten Proteinen, mit Ausnahme von AtpD, handelt es sich um 2 nebeneinanderliegende Spots, deren pI-Werte nur gering vom theoretischen Wert abweichen. Das Auftreten von solchen Proteinketten kann durch Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen oder Entfernen des Startmethionins durch die entsprechende Peptidase erklärt werden (Büttner *et al.*, 2001).

Bei den Proteinen AotJ, NirB und OprE ist jedoch eine deutliche Abweichung des praktischen Wertes vom theoretischen Wert erkennbar. Wie beim Molekulargewicht schon beschrieben, könnte auch hier als denkbarer Grund für eine solche Änderung das Abspalten einer bestimmten Anzahl von Aminosäuren sein. Als solche Regionen kommen bei Proteinen Signaltbereiche, bzw. Signalpeptide (SP) in Frage. Diese Peptide sind im allg. 15 – 60 Aminosäuren lange Sequenzen, welche nach einem abgeschlossenen Sortierungsprozess oft durch eine Signalpeptidase abgeschnitten werden. Mit dem Programm JVirGel ist es möglich, Vorhersagen über mögliche Signalpeptidsequenzen zu machen, diese dann zu entfernen und die theoretischen Werte für pI und Mr neu zu berechnen. In folgender Tabelle (Tab.14) sind die Proteine aufgeführt, die laut JVirGel eine mögliche Signalsequenz besitzen.

**Tab.14: Theoretische mit Signalpeptidsequenz, theoretische ohne Signalpeptidsequenz und praktisch ermittelte pI-Werte und Molekulargewichte einiger im 2D-Gel (Abb.23) identifizierten Proteine.** Die Bestimmung erfolgte mit dem Programm JVirGel. Es wurden zu jedem Protein die PA-Nummer, das dazugehörige Gen, die praktischen (prakt.) und theoretischen (theo.) Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte angegeben. Weiterhin wurde der theoretische pI und das theoretische Mr ohne mögliche Signalpeptidsequenz (SP), sowie die Wahrscheinlichkeit P(SP), dass die abgespaltene Sequenz ein Signalpeptid ist, aufgeführt.

| pI<br>(prakt.) | pI<br>(theo.) | pI<br>(ohne SP) | PA   | Gen         | Mr<br>(prakt) | Mr<br>(theo) | Mr<br>(ohne SP) | P(SP) |
|----------------|---------------|-----------------|------|-------------|---------------|--------------|-----------------|-------|
| 5,484          | 6,75          | 5,17            | 0888 | <b>aotJ</b> | 28,368        | 27,99        | 25,78           | 1     |
| 6,079          | 6,49          | 5,65            | 4922 | <b>azu</b>  | 14,373        | 15,99        | 13,85           | 0,994 |
| 7,840          | 8,26          | 7,13            | 0519 | <b>nirS</b> | 58,840        | 62,63        | 60,02           | 0,974 |
| 7,005          | 8,93          | 6,25            | 0291 | <b>oprE</b> | 46,367        | 49,64        | 46,61           | 0,965 |
| 5,907          | 8,93          | 6,25            | 0291 | <b>oprE</b> | 46,367        | 49,64        | 46,61           | 0,965 |
| 6,605          | 8,93          | 6,25            | 0291 | <b>oprE</b> | 46,367        | 49,64        | 46,61           | 0,965 |
| 6,228          | 8,93          | 6,25            | 0292 | <b>oprE</b> | 46,367        | 49,64        | 46,61           | 0,965 |
| 5,782          | 6,08          | 5,44            | 0423 | <b>ycel</b> | 18,790        | 20,76        | 18,42           | 1     |

In der Spalte mit „P(SP)“ sind die Wahrscheinlichkeiten angegeben, mit welcher die theoretisch abgespaltene Sequenz ein Signalpeptid ist. Je näher dieser Wert der Zahl 1 kommt, umso wahrscheinlicher ist die Vorhersage. Desweiteren sind in der Tabelle nochmals die praktisch bestimmten Werte angegeben, die theoretischen und die neu berechneten, theoretischen (ohne SP) Werte.

Die Auflistung macht deutlich, dass sowohl bei OprE, als auch bei AotJ eine abgespaltene Signalsequenz die mögliche Ursache für die starken Abweichungen sein kann. Jedoch können hiermit die Differenzen bei NirB und PA5497 nicht erklärt werden. Die Wahrscheinlichkeiten, dass die Abweichung durch die Abspaltung eines Signalpeptids bedingt wird, beträgt für NirB 0,019 und für PA5497 ist sie gleich 0.

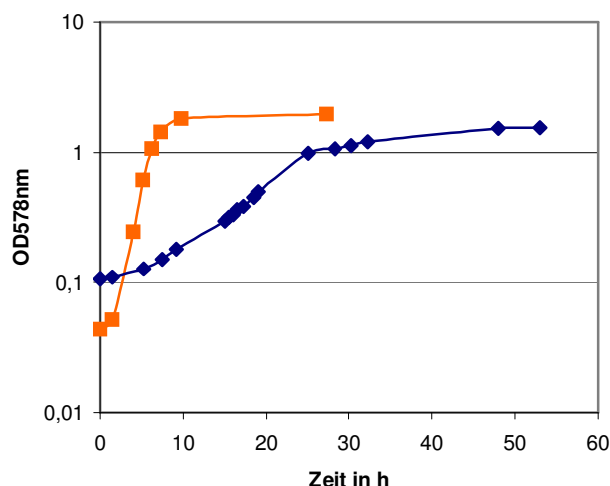
Wenn man alle acht neu berechneten pI-Werte im Diagramm berücksichtigt erhöht sich der Korrelationskoeffizient auf 0,8738 (siehe Abb.31). Im Vergleich dazu betrug der Koeffizient vorher 4,066.

Trotzdem die Schwankungen beim Molekulargewicht vorher schon sehr gering waren, erhöht sich auch hier der Koeffizient nach dem Entfernen der Signalsequenzen von 0,9671 auf 0,9765 (beide Werte ohne NirB und PA5497). Das wiederum verdeutlicht, dass die Abspaltung von wenigen Aminosäuren auf den pI-Wert einen größeren Einfluss haben kann als auf das Molekulargewicht.

### **3.1.4 Analyse des Proteoms von *P. aeruginosa* (PAO1) unter denitrifizierenden Bedingungen im Minimalmedium AB**

Im Gegensatz zum komplexen Vollnährmedium LB, welches nicht genau definierte Komponenten wie Hefeextrakt und Trypton enthält, sind im Minimalmedium AB nur die notwendigsten Substanzen in definierter Form enthalten. Vollnährmedien enthalten außer den lebensnotwendigen auch wachstumsfördernde Bestandteile. Dies zeigt sich auch deutlich in den Wachstumskurven von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor (Abb.32) wieder.

Die Generationszeit in Minimalmedium (AB) beträgt 6 h und 48 min, im Vollnährmedium LB beträgt die Verdopplungszeit hingegen nur 1 h und 4 min. Da im Minimalmedium die zum Wachstum benötigten Stoffe teilweise selbst produziert werden müssen, sind vermutlich unter diesen Bedingungen auch mehr, bzw. andere Synthesewege angeschaltet. Dieser Unterschied müsste auch im Proteinmuster zu beobachten sein. Um weitere, unter denitrifizierenden Bedingungen induzierte Proteine zu identifizieren, wurden 2D-Gele von *P. aeruginosa* im Minimalmedium AB sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen angefertigt.



**Abb.32: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* Wildtyp unter denitrifizierenden Bedingungen (50 mM Nitrat) in Vollnährmedium ( —■— ) und Minimalmedium ( —■— ).**

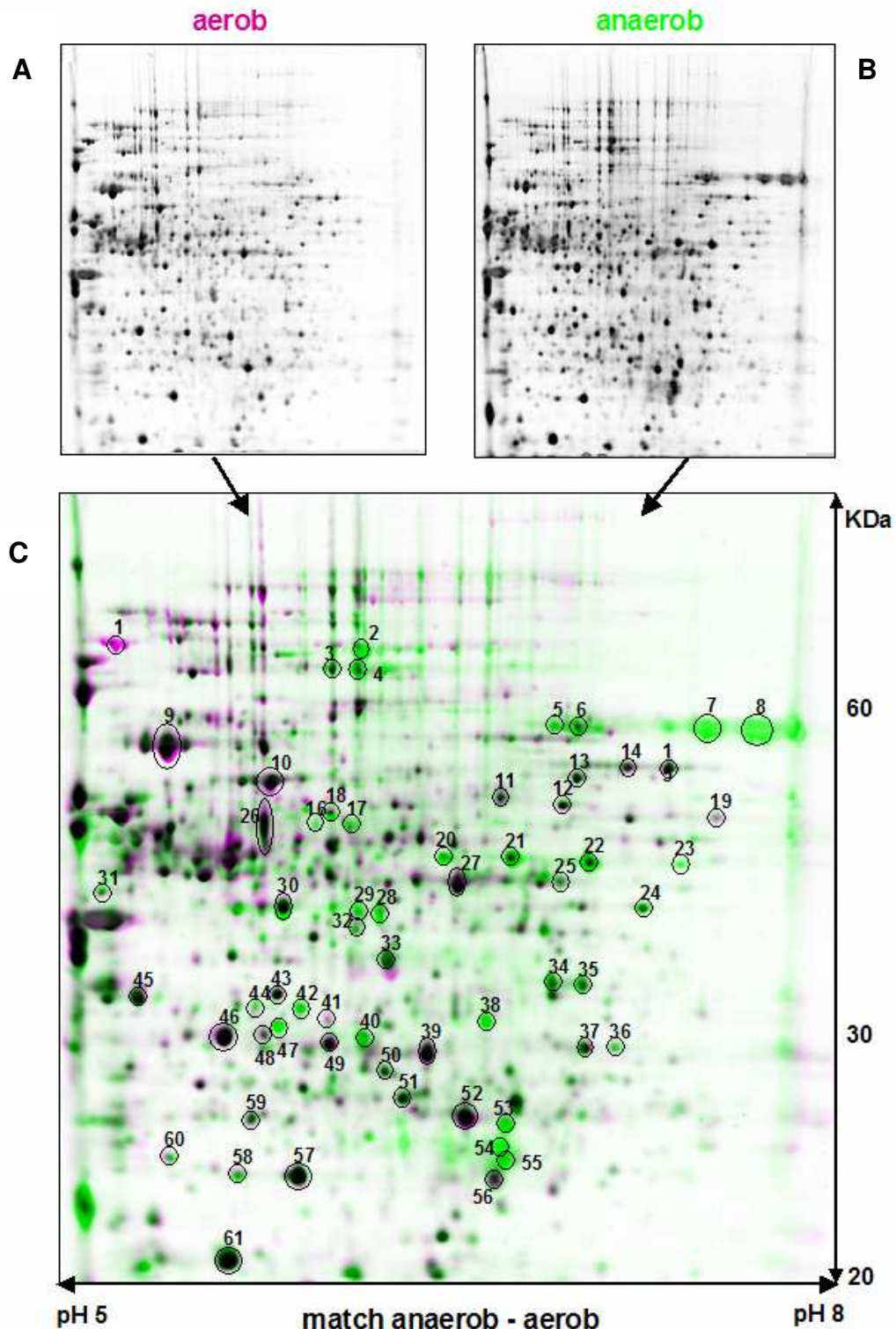
Unter folgenden Wachstumsbedingungen (Tab.15) wurden die Zellen gezüchtet und für die 2D-Analyse vorbereitet. Im Vergleich zur vorhergehenden Probenpräparation (LB) wurde hier neben dem Medium auch die Acrylamidkonzentration der SDS-PAGE in der 2. Dimension geändert.

**Tab.15: Wachstumsbedingungen der *P. aeruginosa* Wildtypkulturen unter aeroben und anaeroben Bedingungen im Minimalmedium**

| Bedingungen                   | Aerober / Anaerober Ansatz |
|-------------------------------|----------------------------|
| Medium                        | AB                         |
| e-Akzeptor                    | Sauerstoff / Nitrat        |
| OD <sub>578nm</sub> Zellernte | 0,5                        |
| Aufgetragene Proteinmenge     | 700 µg                     |
| pH-Gradienten                 | 5 - 8                      |
| Polyacrylamidkonz.            | 10%                        |

Von jedem Ansatz konnten von drei Gelen, aufgrund unzureichender Auftrennung, nur zwei zu einem Mastergel zusammengefasst werden. Beide Mastergele wurden dann miteinander verglichen. In Abbildung 33 sind die Mastergele beider Zustände einzeln und übereinander gelegt dargestellt.

Die in Bild C (Abb. 33) mit einem schwarzen Kreis gekennzeichneten Proteine wurden identifiziert und sind in folgenden Tabellen aufgelistet. Auch hier erfolgte eine Unterteilung in drei Gruppen, wonach in der ersten Gruppe die anaerob induzierten Proteine zu finden sind, in der zweiten die aerob induzierten und die dritte Gruppe bilden die Proteine, deren Bildung von der getesteten Bedingung nicht beeinflusst wird.



**Abb.33: Vergleich der Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtypzellen aus aerob und anaerob wachsenden Kulturen in AB-Medium.**

Es wurden jeweils 700 µg Protein in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 10 %-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung visualisiert. A: Proteinmuster von aerob wachsenden Zellen, B: Proteinmuster von anaerob (50 mM Nitrat) wachsenden Zellen, C: Überlagerung beider Gele, wobei Bild A (aerob) in rot und Bild B (anaerob) in grün dargestellt sind. Identische Proteinmengen führen bei der Überlagerung zu schwarzen Proteinflecken.

### 3.1.4.1 Gruppe 1: Anaerob induzierte Proteine bei Wachstum auf Minimalmedium mit Nitrat

**Tab.16: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps in AB-Medium im Vergleich zu aeroben Bedingungen unter denitrifizierenden Bedingungen induziert wurden.**

Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb.33), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein  | pl theor. | Mw theor. | RE anaerob | RE aerob | DE           |
|----|------|--|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| 2  | 5497 | hypothetisches Protein                             | 5,67      | 82,71     | 4576       | -        | -            |
| 4  | 3790 | OprC Put. Kupfertransportporin der äußeren Membran | 5,98      | 79,28     | 2777       | 1502     | <b>0,45</b>  |
| 5  | 4236 | KatA Katalase                                      | 6,21      | 55,56     | 1739       | 833      | <b>0,4</b>   |
| 7  | 1781 | NirB Assimilatorische Nitritreduktase (große UE)   | 6,32      | 89,67     | 9261       | -        | -            |
| 8  | 0519 | NirS Nitritreduktase (precursor)                   | 8,26      | 62,63     | 6471       | -        | -            |
| 16 | 5171 | ArcA Arginin-Deiminase                             | 5,37      | 46,41     | 676        | 393      | <b>0,49</b>  |
| 18 | 4974 | OpmH probl. Protein der äußeren Membran            | 5,66      | 53,38     | 2711       | 1477     | <b>0,46</b>  |
| 21 | 0291 | OprE anaerob induziertes Porin der äußeren Membran | 8,93      | 49,64     | 10614      | 3030     | <b>0,24</b>  |
| 22 | 0291 | OprE anaerob induziertes Porin der äußeren Membran | 8,93      | 49,64     | 13929      | 3708     | <b>0,22</b>  |
| 23 | 0291 | OprE anaerob induziertes Porin der äußeren Membran | 8,93      | 49,64     | 1010       | -        | -            |
| 24 | 1337 | AnsB Glutaminase-Asparaginase                      | 6,67      | 38,62     | 3340       | 1400     | <b>0,35</b>  |
| 27 | 1588 | SucC Succinyl-CoA Synthase (alpha chain)           | 5,76      | 41,52     | 10324      | 5362     | <b>0,43</b>  |
| 31 | 5258 | HemX hypothetisches Protein                        | 4,75      | 40,74     | 1283       | 712      | <b>0,46</b>  |
| 32 | 0295 | probl. periplasmatisches Polyamin-Bindeprotein     | 5,56      | 38,96     | 1245       | -        | -            |
| 34 | 3195 | GapA Glyceraldehyd- 3-phosphat-Dehydrogenase       | 6,16      | 36,15     | 6949       | 3112     | <b>0,37</b>  |
| 36 | 3836 | hypothetisches Protein                             | 8,35      | 34,28     | 1290       | 768      | <b>0,49</b>  |
| 38 | 4352 | konserviertes hypothetisches Protein               | 5,83      | 30,95     | 4862       | 393      | <b>0,068</b> |
| 40 | 0024 | HemF Coproporphorynogen III Oxidase, aerob         | 5,49      | 34,75     | 4225       | 707      | <b>0,14</b>  |
| 42 | 1789 | hypothetisches Protein                             | 5,2       | 31,25     | 2132       | 413      | <b>0,16</b>  |
| 47 | 0520 | NirQ regulatorisches Protein NirQ                  | 5,13      | 28,88     | 2983       | 1285     | <b>0,36</b>  |
| 53 | 1863 | ModA Periplasmatisches Molybdat-Bindeprotein       | 6,36      | 26,36     | 6010       | 329      | <b>0,05</b>  |
| 54 | 5496 | hypothetisches Protein                             | 5,96      | 24,86     | 7846       | -        | -            |
| 55 | 5496 | hypothetisches Protein                             | 5,96      | 24,86     | 3560       | -        | -            |

Wie auch schon im Vollnährmedium LB konnten in AB Proteine identifiziert werden, welche am anaeroben Stoffwechsel beteiligt sind und somit unter anaeroben Bedingungen induziert vorliegen (Tab.16). Dazu gehören die dissimilatorische Nitritreduktase NirS, der Regulator NirQ und die für die Kofaktorsynthese wichtige Coproporphorynogen III Oxidase HemF. Desweiteren wurde die assimilatorische Nitritreduktase NirB auch im Minimalmedium nur unter anaeroben Bedingungen gebildet.



Das anaerob induzierte Porin der äußeren Membran OprE konnte auch hier als multipler Proteinfleck (4 Varianten) identifiziert werden, wobei ein Protein nur 1,58-fach induziert vorliegt und somit bei den nicht regulierten Proteinen eingereiht wurde.

Ebenfalls konnten im Minimalmedium drei Proteine des Arginin verwertenden *arcDABC*-Operons nachgewiesen werden, wobei ArcB (Protein-Nr. 25) und ArcC (Protein-Nr. 44) in beiden Gelen, aerob und anaerob, gleich stark gebildet vorlagen (Tab.18) und nur ArcA (Protein-Nr. 16) 2,05-fach induziert wurde. Da Nitrat als alternativer Elektronenakzeptor dem Medium zugegeben wurde und sowohl Nitrat als auch Nitrit eine Induktion der Enzyme der Argininfermentation unter anaeroben Bedingungen verhindern (Mercenier *et al.*, 1980), kann davon ausgegangen werden, dass die doch sehr geringe Induktion nicht signifikant ist. Dies wird bestärkt durch die Tatsache, dass ArcA zweimal im Gel identifiziert werden konnte (Protein-Nr. 16 und 17) und der zweite Spot, wie ArcB und ArcC, keine Induktion erfuhr.

Wie auch schon im Vollnährmedium konnte im 2D-Gel (Abb.33, Protein-Nr. 5 und 6) die Katalase KatA zweimal identifiziert werden. Ein Protein von beiden ist während der Anaerobiose leicht induziert (2,5-fach), wo hingegen der andere unreguliert vorliegt (siehe Tab.18).

Neben Peroxidasen, Superoxid-Dismutasen sind die Katalasen Enzyme, welche die Zelle vor reaktiven Sauerstoffderivaten schützen. Dabei setzen Katalasen Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff um.

In *P. aeruginosa* wird die Expression von *katA* durch Eisen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert (Ma *et al.*, 1999). Da sowohl die Superoxid-Dismutase SodB als auch TsaA, als mögliche Peroxidase, unter diesen Bedingungen nicht induziert wurden (s.Tab.19) kann oxidativer Stress, bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Induktionssignal ausgeschlossen werden.

Untersuchungen von Frederick *et al.* (2001) zeigten, dass Nitrat-atmende Zellen von *P. aeruginosa* in der Stationärphase eine zweifach gesteigerte Katalase-Aktivität aufwiesen, als aerob kultivierte Zellen. Ergänzend dazu, weisen die Ergebnisse der Proteomanalyse auf eine erhöhte Produktion von KatA in der logarithmischen Phase hin. Bioinformatische Analysen des Promotorbereiches von *katA* konnten weiterhin eine potentielle Anr-Bindestelle vorhersagen.

Übereinstimmend mit dem Proteinmuster im LB-Medium wurden die hypothetischen Proteine PA4352, PA5496 und PA5497 auch im Minimalmedium anaerob induziert vorgefunden (Protein-Nr. 38, 54/55, 2). Zusätzlich konnten fünf weitere induzierte

hypothetische Proteine, PA0295, PA1789, PA3836, PA4974 und PA5258, mit noch unbekannter Funktion identifiziert werden.

Aufgrund seiner 57%-igen Ähnlichkeit zu PotF in *E. coli* und einer vorhandenen periplasmatischen Spermidin/Putrescin-Bindeprotein Signatur vermutet man, dass PA0295 (Protein-Nr. 32) ein Transportprotein für Putrescin ist.

Bei OpmH (PA4974; Protein-Nr. 31) handelt es sich auf Grund seiner 54%-igen Ähnlichkeit zu TolC in *E. coli*, einem Kanal in der äußeren Membran, möglicherweise auch in *P. aeruginosa* um ein Protein der äußeren Membran.

Für das hypothetische Protein PA1789 (Protein-Nr. 42) konnte Nelli Bös während ihrer Diplomarbeit mittels der Datenbank SwissProt (<http://au.expasy.org/>), wie auch schon bei dem Protein PA4352 (Abb.23, Protein-Nr. 24), zwei USP-Domänen ermitteln. Aufgrund dieser konservierten Aminosäuresequenz-Bereiche kann PA1789 ebenfalls als „Universal stress protein“ bezeichnet werden. Bioinformatische Analysen der Promotorregion des dazugehörigen Gens zeigten eine potentielle Anr-Bindestelle, welche die 6,17-fache Induktion von PA1789 unter anaeroben Bedingungen erklären würde.

PA5258 (Protein-Nr. 31) wird aufgrund seiner Ähnlichkeit (46%) zur Uroporphyrinogen III Methylase in *E. coli* auch als HemX bezeichnet. In *P. aeruginosa* ist das dazugehörige Gen ebenso wie bei *E. coli* downstream von *hemCD* zu finden. Das Enzym katalysiert zwei aufeinander folgende Methylierungs-Reaktionen, die Bildung von Precorrin-1 aus Uroporphyrinogen III und die Umsetzung von Precorrin-1 zu Precorrin-2. Beide Reaktionen sind die ersten Schritte in der Sirohäm-synthese aus Uroporphyrinogen III (ExPASy-Datenbank, <http://ca.expasy.org/>).

Neben diesen noch nicht näher untersuchten Proteinen wurden auch fünf neue Proteine mit bekannter Funktion im 2D-Gel (Abb.33) identifiziert.

Eines davon ist ModA (Protein-Nr. 53), ein periplasmatisches Molybdä-Bindeprotein und Teil des modABC-Operons in *P. aeruginosa*. Dieses Operon codiert die Information für drei Proteine, welche ein Molybdän-Aufnahme-System bilden. In *E. coli* fungieren diese drei Proteine als ABC-Transporter. ModA ist das periplasmatische Protein, welches Molybdän bindet und zu ModB transferiert und als integrales Membranprotein ist ModB mit ModC assoziiert, das letztendlich unter ATP-Verbrauch das Molybdän ins Cytoplasma entlässt (Rech *et al.*, 1995). Dort wird das Metall als essentielle Komponente für die Synthese des Molybdopterin-Guanin-Dinukleotids, kurz MGD, gebraucht. Dieses wiederum kommt in vielen Molybdoenzymen vor und katalysiert Redoxreaktionen mit Elektronentransport in oder aus den Quinonpool. Die Reduktion von Nitrat zu Nitrit während der Denitrifikation findet zum Beispiel am MGD der Nitratreduktase-Untereinheit NarG statt.

Die Expression des *modABCD*-Operons in *E. coli* wird primär durch die Verfügbarkeit von Molybdän und dem Regulator ModE kontrolliert. Dabei fungiert ModE als klassischer Repressor, der an einer bestimmten Sequenz im Promotorbereich vor *modA* an die DNA bindet und die Expression um 65% verringert. Durch Anwesenheit von Molybdän wird die Repression des *modABCD*-Operons auf über 90% verstärkt (Grunden *et al.*, 1996). Weder Sauerstoff noch Nitrat haben einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression (Rech *et al.*, 1995).

Im Proteinmuster konnte unter anaeroben Bedingungen eine starke Induktion von ModA beobachtet werden (DE 0,046 = 21,74-fach). Eine mögliche Ursache könnte ein Mangel an Molybdän während der Denitrifikation sein. Übereinstimmend mit dem Ergebnis der Analysen im LB-Medium, wo das Molybdopterin-Biosynthese-Protein MoaB1 nur im anaeroben Zustand detektiert werden konnte (s. Seite 76), kann auf einen erhöhten Verbrauch an Molybdän unter denitrifizierenden Bedingungen geschlossen werden. Weiterhin konnte für den Promotorbereich von *modA* eine potentielle Anr-Bindestelle vorhergesagt werden, was eine Sauerstoff-abhängige Regulation vermuten lässt.

Das Protein C (Protein-Nr. 3 und 4) der äußeren Membran, kurz OprC, ist ebenfalls unter denitrifizierenden Bedingungen induziert (DE 0,45 = 2,22-fach). OprC bildet bei *P. aeruginosa* schmale Kanäle durch die Membran und fungiert als Kupfer-bindendes Protein (Yoneyama und Nakae, 1996). Kupfer ist als Metall, wie auch Molybdän, häufig ein Kofaktor oder Bestandteil von Enzymen. Einige Superoxid-Dismutasen, aber vor allen die Cytochrom-c-Oxidase enthalten Kupfer als Kofaktor. Eine während der Denitrifikation wichtige Cytochrom-c-Oxidase ist die N<sub>2</sub>O-Reduktase. Die N<sub>2</sub>O-Reduktase von *P. aeruginosa* ist wie die meisten N<sub>2</sub>O-Reduktasen ein im Periplasma lokalisiertes Multi-Kupferenzym (SooHoo und Hollocher, 1991). Als Dimer vorliegend, enthält jede Untereinheit dieses Enzyms zwei Kupferzentren, Cu<sub>A</sub> und Cu<sub>Z</sub>, wobei Cu<sub>A</sub> ein Di-Kupferzentrum ist (Brown *et al.*, 2000). Das lässt vermuten, dass während der Denitrifikation ein erhöhter Bedarf an Kupferionen besteht und somit die Induktion von OprC unter diesen Bedingungen erklärt werden kann. Untersuchungen von Yoneyama und Nakae (1996) haben ergeben, dass in *P. aeruginosa* exogene Cu<sup>2+</sup>-Ionen die Expression von OprC scheinbar unterdrücken, diese Repression aber während des anaeroben Wachstums mit Nitrat wieder aufgehoben wird. Das bestätigt die Annahme, dass die Verfügbarkeit von Kupfer und somit auch OprC eine wichtige Rolle während der Denitrifikation spielen.

Beim Vergleich von aerob wachsenden mit anaerob wachsenden Zellen in Minimalmedium konnten 4 Genprodukte detektiert werden, die dem Genclusters *getA-sdhCDAB-sucAB-lbdG-sucCD* angehören, welcher für 10 Gene des Citratzykluses codiert.

Als zentraler Stoffwechselweg ist der Citratzyklus zuständig für die Oxidation von Pyruvat zu CO<sub>2</sub> und die dabei entstehenden Zwischenprodukte sind Ausgangssubstrate für Biosynthesewege. Einige der Enzyme, welche die Oxidationsschritte katalysierenden, übertragen die ihrem Substrat entzogenen Elektronen auf NAD<sup>+</sup>. Über die Elektronentransportkette wird das entstandene NADH reoxidiert und der eigentliche Elektronenakzeptor (Sauerstoff oder Nitrat) reduziert.

Neben der bereits in LB-Medium identifizierten SucB (LB: Abb.23, Protein-Nr.11; AB: Abb.33, Protein-Nr. 26), konnten zusätzlich die Proteine SucCD (Protein-Nr. 27 und 39) sowie LbdG (Protein-Nr. 14 und 15) identifiziert werden. SucC und SucD wurden in *P. aeruginosa* auf Grund ihrer hohen Ähnlichkeit (83% und 93%) zu *E. coli* SucCD annotiert und LpdG zeigte eine 100%-ige Ähnlichkeit zur Lipoamid-Dehydrogenase in *P. fluorescens* (www. Pseudomonas.com). In folgender Tabelle (Tab.17) sind diese Proteine und ihre DE-Werte zusammengefasst aufgelistet.

**Tab.17: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps in AB-Medium gebildet wurden und einem Gencluster des Citratzykluses angehören.** Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb.33), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein   | pl theor. | Mw theor. | RE anaerob | RE aerob | DE          |
|----|------|---|-----------|-----------|------------|----------|-------------|
| 26 | 1586 | SucB Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (E2 subunit) | 5,2       | 42,86     | 9593       | 12756    | <b>1,11</b> |
| 14 | 1587 | LpdG Lipoamid-Dehydrogenase-glc                       | 6,51      | 50,14     | 1999       | 3762     | <b>1,57</b> |
| 15 |      | LpdG  |           |           | 3681       | 5938     | <b>1,35</b> |
| 27 | 1588 | SucC Succinyl-CoA Synthase (alpha chain)              | 5,76      | 41,52     | 10324      | 5362     | <b>0,43</b> |
| 39 | 1589 | SucD Succinyl-CoA Synthase (beta chain)               | 5,71      | 30,24     | 6038       | 11052    | <b>1,53</b> |

Die DE-Werte zeigen, dass mit einer Ausnahme keine signifikante Induktion der Proteine während der Nitratatmung erfolgte. Nur SucC zeigte eine Steigerung um das 2,3-fache unter anaeroben Bedingungen. Aufgrund der DE-Werte der anderen Proteine und der Tatsache, dass *sucC* und *sucD* in einem Operon exprimiert werden, ist die in diesem Falle geringe Induktion wahrscheinlich nicht signifikant.

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) GapA (Protein-Nr.34 und 35), konnte im 2D-Gel als multipler Spot nachgewiesen werden. Auch hier unterschieden sich

die DE-Werte beider Proteine. Die Bildung eines der Proteine blieb unbeeinflusst (siehe Tab.19) und das andere Protein erfuhr unter denitrifizierenden Bedingungen eine 2,67-fache Induktion (DE 0,37).

Die GAPDH spielt während des Abbaus von Glukose eine wichtige Rolle, indem sie Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat umwandelt. Dabei werden die Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  übertragen und NADH und  $\text{H}^+$  gebildet. Diese Umsetzung findet sowohl während der Glykolyse, als auch beim Entner-Doudoroff-Weg, welchen *P.aeruginosa* nutzt, statt.

Promotoranalysen in *E. coli* zeigten, dass durch Zugabe von Glukose zum Medium die Expression von *gapA* sehr schnell und stark induziert wurde, auch war die GAPDH-Aktivität unter diesen Bedingungen deutlich erhöhte (Gschaedler *et al.*, 1999). Ebenfalls in *E. coli* konnte eine pH-abhängige Expression von *gapA* nur unter anaeroben, fermentativen Bedingungen nachgewiesen werden, wobei es zu einer Steigerung im basischen Milieu kam (Yohannes *et al.*, 2004). Eine Ursache für eine Induktion von *gapA* in *P. aeruginosa* wird im Zusammenhang mit folgendem Protein (AnsB) diskutiert.

Als letztes anaerob induziertes (2,86-fach) Protein in AB-Medium ist AnsB (Protein-Nr. 24) zu nennen. Diese Glutaminase-Asparaginase hat eine 88%-ige Ähnlichkeit zur AnsB von *Pseudomonas sp. 7A*, anhand deren Sequenz AnsB auch in *P. aeruginosa* annotiert wurde. AnsB, auch als L-Asparaginase II bezeichnet, ist ein hoch affines Enzym, welches ins Periplasma sekretiert wird und somit rein katabolischen Charakters ist (Cedar and Schwartz, 1967). Aufgrund eines fehlenden Aufnahmesystems von Glutamin wird vermutet, dass *P. aeruginosa* Glutamin im Periplasma über AnsB zu Glutamat umgesetzt, welches dann ins Cytoplasma aufgenommen werden kann. Das Enzym setzt sowohl Asparagin zu Aspartat, als auch Glutamin zu Glutamat um. Bei beiden Reaktionen wird Ammoniak freigesetzt, welches sich im Medium anreichern kann (Sonawane *et al.*, 2003). Eine mögliche Anreicherung von Ammoniak im Medium und das damit verbundene Verschieben des pH-Wertes in Richtung basisches Milieu, könnte die Induktion von *gap A* (siehe oben) verursachen.

Für *E. coli ansB* konnten eine sehr komplexe Regulation der Expression gezeigt werden. Die Transkription des *ansB*-Genes ist unter anderem positiv reguliert durch das Aktivator-Protein Crp („cAMP receptor protein“) und dem anaeroben Regulator Fnr (Jennings und Beacham, 1990). Dabei wird der Promotor von beiden Regulatoren über eine Tandem-Bindung co-aktiviert (Scott *et al.*, 1995). In *P. aeruginosa* konnte ebenfalls eine Induktion von AnsB unter anaeroben Bedingungen beobachtet werden. Jedoch erfolgt hier keine direkte Regulation über den Fnr-verwandten Regulator Anr, da die bioinformatischen Analysen des Promotorbereiches keine potentielle Anr-Bindestelle detektieren konnten.

In *P. fluorescens* und *P. putida* wirkten sich Asparagin und Glutamin induzierend auf die Expression von *ansB* aus, Glukose hingegen reprimierend. Da sich im Medium (Minimalmedium AB) keine der beiden Aminosäuren befand und Glukose sowohl im aeroben als auch im anaeroben Ansatz als C-Quelle diente, bleibt die erhöhte Bildung von AnsB unter anaeroben Bedingungen weiterhin unklar.

### 3.1.4.2 Gruppe 2 : Aerob induzierte Proteine bei Wachstum auf Minimalmedium mit Nitrat

Als Ergebnis der Analyse konnten vier Proteine detektiert werden, welche unter aeroben Bedingungen im Minimalmedium stärker gebildet wurden.

**Tab.18: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps in AB-Medium im Vergleich zu denitrifizierenden Bedingungen unter aeroben Bedingungen induziert wurden.**

Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb.33), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein  | pI<br>theor. | Mw<br>theor. | RE<br>anaerob | RE<br>aerob | DE   |
|----|------|--|--------------|--------------|---------------|-------------|------|
| 1  | 0781 | hypothetisches Protein   | 4,72         | 74,18        | -             | 7839        | -    |
| 19 | 3001 | mögliche Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase                        | 8,32         | 50,09        | 257           | 1447        | 4,71 |
| 41 | 1544 | Anr anaerober Regulator Anr  | 5,2          | 27,11        | 278           | 1421        | 4,28 |
| 48 | 3639 | AccA Acetyl-Coenzym A Carboxylase Carboxyl Transferase (alpha subunit) | 5,14         | 34,92        | 656           | 1691        | 2,15 |

Das am deutlichsten induzierte Protein ist PA0781, ein hypothetisches Protein, dessen Funktion bis heute noch nicht geklärt wurde. Aufgrund struktureller Eigenschaften wird angenommen, dass es sich hierbei um ein Protein der äußeren Membran handelt. Im Rahmen der Charakterisierung des *putAP* (proline catabolic)- Operons in *P. aeruginosa* wurde eine PA0781 Knockout-Mutante untersucht, mit dem Ergebnis, dass PA0781, welches upstream von *putAB* liegt, keinen Einfluss auf die Prolinverwertung hat (Nakada *et al.*, 2002).

Ein weiteres Protein mit bisher unbekannter Funktion ist PA3001. Aufgrund seiner 76% Ähnlichkeit zu einer möglichen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in *Streptomyces roseofulvus* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) und einer 84% Ähnlichkeit zu Gap-2 in *P. putida* ([www.prodoric.de](http://www.prodoric.de)) handelt es sich bei diesem Protein wahrscheinlich auch in *P. aeruginosa* um eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Wie schon auf Seite 99 beschrieben, spielt dieses Enzym während des Abbaus von Glukose eine wichtige Rolle, indem sie Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat umwandelt.

Im Gegensatz zur Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) GapA (Protein-Nr.34 und 35), welche anaerob stärker nachgewiesen werden konnte, wird die mögliche Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase PA3001 aerob stärker gebildet.

Im 2D-Gel (Abb.33) konnte der anaerobe Regulator Anr identifiziert werden (Protein-Nr.4). Anr steht für „anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction“ und ist ein Einkomponenten-Regulationssystem, das sowohl Sensor für den Redoxzustand der Zelle, als auch DNA-bindender Transkriptionsfaktor ist (siehe Einleitung Kap. 1.5.1).

Durch die Proteomanalysen konnte, im Vergleich zur Denitrifikation, unter aeroben Bedingungen die 4,3-fache Menge an Anr nachgewiesen werden. Das im 2D-Gel detektierte Protein wurde im Bereich von 28 kDa getrennt. Das Protein Anr hat als Monomer eine theoretische Größe von ca. 27 kDa. Demnach handelt es sich bei dem nachgewiesenen Protein um das inaktive Anr-Monomer.

Krieger (2001) zeigte mit Hilfe von *lacZ*-Experimenten, dass *anr* unter aeroben Bedingungen konstitutiv exprimiert wird und anaerob mit Nitrat eine zweifache Induktion erfährt, welche NarL-unabhängig ist. Weiterhin vermutet er, dass die Induktion über die von ihm identifizierte Anr-Bindestelle durch Anr selbst vermittelt wird. Im Gegensatz dazu, konnte Arai *et al.* (1997) ebenfalls über *lacZ*-Fusionen nachweisen, dass die anaerobe Expression von *anr* Anr-, bzw. Dnr-unabhängig erfolgt. Das steht auch im Einklang mit der bioinformatische Analyse des Promotorbereiches von *anr*, bei welcher keine potentielle Anr-Bindestelle detektiert werden konnte.

Die zweifache Induktion der Expression von *anr* unter anaeroben Bedingungen, steht der ca. vierfach erhöhten Menge an Protein unter aeroben Bedingungen gegenüber. Auch hier wird deutlich, dass man von der Transkription eines Genes nicht auf die Menge vorhandenen Proteins in der Zelle schließen kann. Komplexe Prozesse wie die Transkription der DNA-Sequenz (weitere Regulationsmechanismen), die Translation der mRNA in Protein, dessen Transport zum Wirkungsort, die post-translationale Modifikation und der Abbau des Proteins nehmen Einfluß.

Als letztes leicht aerob (2,2-fach) induziertes Protein konnte die Carboxyltransferase AccA (Protein-Nr.48) identifiziert werden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit (81%) zu AccA in *E. coli* wurde dieses Protein ebenfalls in *P. aeruginosa* annotiert. AccA ist eine von zwei Carboxyltransferasen der Acetyl-CoA Carboxylase von *E. coli*. Die Acetyl-CoA Carboxylase ist das Schlüsselenzym der Fettsäure-Synthese und katalysiert die Biotin

abhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA. Die Aktivierung oder Hemmung der Fettsäure-Synthese erfolgt dabei auf der Ebene dieses Enzyms.

Die Biotin-Carboxylase AccC (Tab.19, Protein-Nr. 11) ist wie AccA eine Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase und das dazugehörige Gen *accC* bildet wahrscheinlich ein Operon mit dem downstream liegenden *accB* (AccB: Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein). Dieses Protein wurde unter aeroben Bedingungen, wie auch während der Denitrifikation gleich stark synthetisiert. Vermutlich ist die geringe 2,2-fache Induktion von AccA nicht signifikant oder die Transkription beider Untereinheiten wird unterschiedlich reguliert.

### **3.1.4.3 Gruppe 3 : Stark gebildete und in ihrer Konzentration unveränderte Proteine bei Wachstum auf Minimalmedium mit Nitrat**

Um einen Überblick zu bekommen, welche Proteine *P. aeruginosa* während des Wachstums prinzipiell stark bildet, wurden die Proteine höchster Konzentration aus dem Gel ausgestochen und identifiziert. Die meisten dieser Proteine wurden unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit gebildet und sind in der Tabelle (19) der nicht regulierten Proteine zu finden.

Übereinstimmend zur Analyse des Proteinmusters der Zellen aus dem LB-Medium konnten eine Vielzahl der gleichen Proteine auch in Zellen aus Minimalmedium detektiert werden. Dazu gehören neben der Katalase KatA noch ArcAB (Arginin-Pathway), Ppa, RplY (PA4671) und SucB.

Im Vollnährmedium unterschiedlich synthetisiert, im Minimalmedium jedoch in gleichen Mengen vorliegend, sind die Proteine AtpA, AdhA und das hypothetische Protein PA1677. Die Alkohol-Dehydrogenase AdhA und PA1677 wurden unter anaeroben Bedingungen im LB-Medium induziert. Da diese Induktionen im AB-Medium nicht beobachtet werden konnten, ist vermutlich neben den anaeroben Bedingungen auch ein Bestandteil des komplexen Mediums ein Induktionsfaktor.

Im Fall der Untereinheit AtpA der ATP-Synthase konnte im Gegensatz zum Minimalmedium im LB-Medium eine Erhöhung der Proteinmenge unter aeroben Bedingungen gezeigt werden.

Zusätzlich zu diesen schon bekannten Proteinen wurden auch einige bis jetzt noch nicht erwähnte Proteine identifiziert. Im Folgenden werden diese kurz beschrieben.



**Tab.19: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps in AB-Medium sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen gleich stark gebildet wurden.**

Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb. 33), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein  | pI theor. | Mw theor. | RE anaerob | RE aerob | DE          |
|----|------|--|-----------|-----------|------------|----------|-------------|
| 3  | 3790 | OprC put. Kupfertransportporin der äußeren Membr.      | 5,98      | 79,28     | 2378       | 2925     | <b>1,08</b> |
| 6  | 4236 | KatA Katalase  | 6,21      | 55,56     | 2710       | 2671     | <b>0,83</b> |
| 9  | 4385 | GroEL  | 4,8       | 57,06     | 15266      | 19227    | <b>1,05</b> |
| 10 | 5556 | AtpA ATP-Synthase (beta chain)                         | 5,11      | 55,37     | 9003       | 13696    | <b>1,27</b> |
| 11 | 4848 | AccC Biotin Carboxylase                                | 5,88      | 48,86     | 1455       | 2699     | <b>1,55</b> |
| 12 | 0766 | MucD Serin Protease (precursor)                        | 7,43      | 50,3      | 2351       | 4218     | <b>1,5</b>  |
| 13 | 3770 | GuaB Inosin-5-Monophosphat-Dehydrogenase               | 6,22      | 51,68     | 2366       | 4093     | <b>1,43</b> |
| 14 | 1587 | LpdG Lipoamid-Dehydrogenase-glc                        | 6,51      | 50,14     | 1999       | 3762     | <b>1,57</b> |
| 15 |      | LpdG   |           |           | 3681       | 5938     | <b>1,35</b> |
| 17 | 5171 | ArcA Arginin-Deiminase                                 | 5,37      | 46,41     | 709        | 1363     | <b>1,61</b> |
| 20 | 0291 | OprE anaerob induziertes Porin der äußeren Membr.      | 8,93      | 49,64     | 4284       | 3251     | <b>0,63</b> |
| 25 | 5172 | ArcB katabolische Ornithin-Carbonyltransferase         | 6,12      | 38,09     | 1124       | 1204     | <b>1,78</b> |
| 26 | 1586 | SucB Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (E2 subunit)  | 5,2       | 42,86     | 9593       | 12756    | <b>1,11</b> |
| 28 | 5427 | AdhA Alkohol-Dehydrogenase                             | 5,48      | 35,89     | 1587       | 1090     | <b>0,57</b> |
| 29 |      | AdhA   |           |           | 1368       | 912      | <b>0,56</b> |
| 30 | 3190 | GltB probl. Teil d. Bindeprotein des ABC Zuckertransp. | 5,55      | 45,11     | 8967       | 9079     | <b>0,85</b> |
| 33 | 4694 | IlvC Ketolsäure-Reductoisomerase                       | 5,45      | 36,4      | 6084       | 12036    | <b>1,65</b> |
| 35 | 3195 | GapA Glyceraldehyd- 3-phosphat-Dehydrogenase           | 6,16      | 36,15     | 3294       | 2327     | <b>0,59</b> |
| 37 | 3182 | Pgl 6-Phosphogluconolactonase                          | 6,06      | 25,55     | 2856       | 4015     | <b>1,18</b> |
| 39 | 1589 | SucD Succinyl-CoA Synthase (beta chain)                | 5,71      | 30,24     | 6038       | 11052    | <b>1,53</b> |
| 43 | 1127 | Gsp69 probl. Oxidoreductase                            | 5,15      | 36,45     | 3172       | 5248     | <b>1,38</b> |
| 44 | 5173 | ArcC Carbamatkinase                                    | 5,02      | 33,06     | 860        | 804      | <b>0,78</b> |
| 45 | 2951 | EtfA Elektronentransfer-Flavoprotein (alpha subunit)   | 4,73      | 31,4      | 7443       | 7965     | <b>0,89</b> |
| 46 | 3655 | Tsf Elongationsfaktor Ts                               | 5,01      | 30,63     | 12769      | 17394    | <b>1,14</b> |
| 49 | 4920 | NadE NH3-abhängige NAD Synthetase                      | 5,27      | 29,67     | 3709       | 7320     | <b>1,65</b> |
| 50 | 3244 | MinD Zellteilungsinhibitor                             | 5,4       | 29,6      | 1494       | 1869     | <b>1,05</b> |
| 51 | 3397 | Fpr Ferredoxin-NADP+ -Reduktase                        | 5,57      | 29,5      | 4320       | 3905     | <b>0,76</b> |
| 52 | 4671 | RplY probl. ribosomales Protein L25                    | 5,76      | 21,94     | 9090       | 15579    | <b>1,43</b> |
| 56 | 1677 | hypothetisches Protein                                 | 6,05      | 21,01     | 4449       | 5442     | <b>1,02</b> |
| 57 | 3529 | TsaA probl. Peroxidase                                 | 5,22      | 21,8      | 13944      | 18772    | <b>1,13</b> |
| 58 |      | TsaA   |           |           | 2100       | 1411     | <b>0,56</b> |
| 59 | 5148 | YggX konserviertes hypothetisches Protein              | 6,1       | 10,61     | 1625       | 2654     | <b>1,37</b> |
| 60 | 4031 | Ppa anorganische Pyrophosphatase                       | 4,78      | 19,38     | 1170       | 1104     | <b>0,79</b> |
| 61 | 4366 | SodB Superoxid Dismutase                               | 5,12      | 21,33     | 16204      | 19841    | <b>1,02</b> |

Im 2D-Gel (Abb. 33) als Protein-Nr. 12 eingezeichnet, konnte MucD, eine Serinprotease, identifiziert werden. Das dazugehörige Gen liegt in dem *algUmucABCD*-Cluster. AlgU ist ein alternativer Sigmafaktor, welcher bei der Induktion der Alginatebiosynthese eine wichtige Rolle spielt und mit der Ausbildung des mucoiden Phänotyps während der Pathogenese von *P. aeruginosa* assoziiert ist. Die vier Proteine MucABCD sind negative Regulatoren von AlgU (Boucher *et al.*, 1997).

Die Inosin-5-monophosphat-Dehydrogenase GuaB (Protein-Nr. 13) ist in die Nucleotid-Biosynthese involviert und katalysiert dort den ersten Schritt bei der Bildung von Guanin-monophosphat (GMP). Aufgrund seiner 81% Ähnlichkeit zu GuaB in *E. coli* wurde dieses Protein auch im Genom von *P. aeruginosa* annotiert.

Die genaue Funktion des Proteins PA3190 (Protein-Nr. 30) ist noch unbekannt. Da das dazugehörige Gen, dessen alter Name *gltB* ist, im Genom an Membran- und ATP-bindende Untereinheiten angrenzt, handelt es sich vermutlich bei PA3190 um eine Komponente des Bindeproteins eines ABC-Zuckertransporters ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

Bei *P. aeruginosa* ist die Ketolsäure-Reductoisomerase IlvC (Protein-Nr. 33) an der Biosynthese von Aminosäuren, insbesondere von Isoleucin, Leucin und Valin beteiligt.

Die 6-Phosphogluconolactonase Pgl (Protein-Nr. 37) ist ebenso wie GapA (Protein-Nr. 35) involviert in den zyklischen Entner-Doudoroff-Weg, welchen *P. aeruginosa* zum metabolisieren von Kohlenhydraten nutzt (Hager *et al.*, 2000; Lessie and Phibbs, 1984). Pgl katalysiert dabei die Umsetzung von 6-Phosphat-Gluconolacton zu 6-Phosphat-Gluconat (Hager *et al.*, 2000).

Aufgrund seiner 75%-igen Ähnlichkeit zu dem „General stress protein“ Gsp69 lautet der alte Genname des Proteins PA1127 (Protein-Nr. 43) *gsp69*. Weiterführende Analysen ergaben jedoch, dass das Protein eine Aldo/Keto-Reduktase-Familien-Signatur aufweist und es sich wahrscheinlich um eine Oxidoreduktase handelt ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Die genaue Funktion ist allerdings noch unklar.

Bei EtfA (Protein-Nr. 45) handelt es sich um die  $\alpha$ -Untereinheit des Elektronentransfer-Flavoproteins ETF. Die  $\beta$ -Untereinheit wird von dem upstream gelegenen *etfB*-Gen codiert. Das in *P. aeruginosa* annotierte EtfA besitzt eine 77%-ige Ähnlichkeit zu EtfA in *Paracoccus denitrificans*.

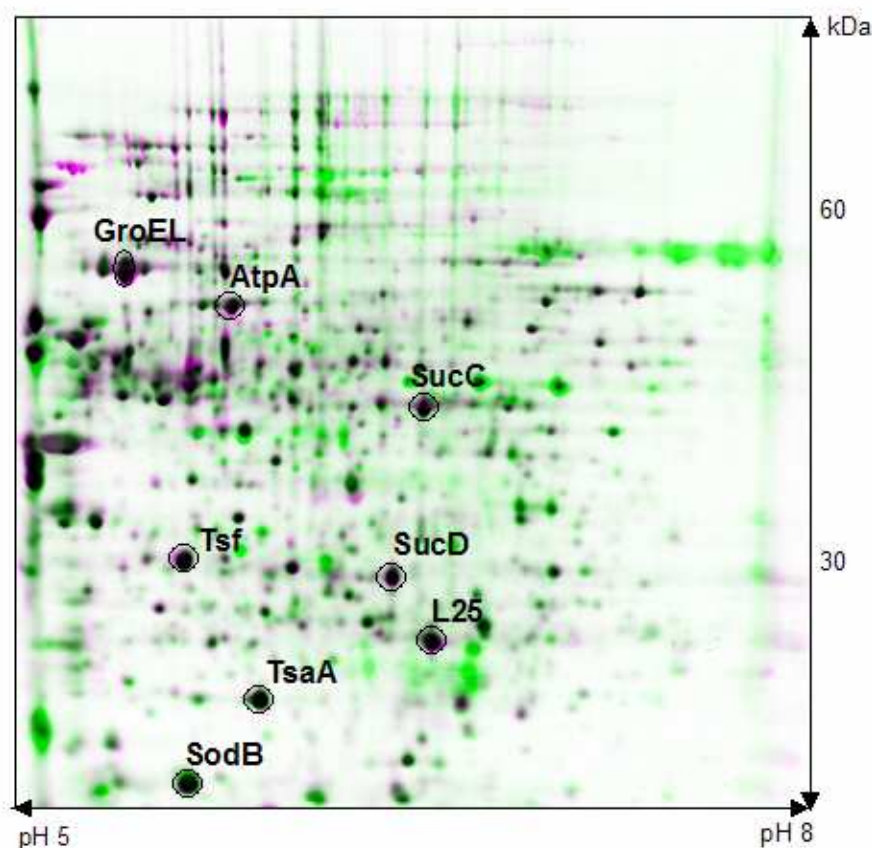
Als Protein-Nr. 49 konnte die  $\text{NH}_3$ -abhängige NAD-Synthetase NadE identifiziert werden. Unter Verbrauch von ATP katalysiert dieses Enzym die Bildung von  $\text{NAD}^+$ , wobei Glutamin zu Glutamat umgesetzt wird. Dieses Protein wurde aufgrund seiner 65%-igen Ähnlichkeit zu NadE in *E. coli* im Genom von *P. aeruginosa* annotiert.

Das Gen des Zellteilungsinhibitors MinD (Protein-Nr. 50) ist Teil des konservierten Genclusters *minEDC*. Die Annotation in *P. aeruginosa* erfolgte ebenfalls aufgrund seiner hohen (89%) Ähnlichkeit, in diesem Falle zu MinD, aus *E. coli*.

Ebenfalls aufgrund hoher Sequenzähnlichkeit wurde die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (Protein-Nr. 51) in *P. aeruginosa* annotiert. Es besteht eine 91%-ige Ähnlichkeit zur Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase in *Azotobacter vinelandii*. Das Enzym reduziert NADP<sup>+</sup> zu NADPH, welches dann im Calvin-Zyklus als Reduktionskraft genutzt wird.

Bei PA5148 handelt es sich um ein konserviertes hypothetisches Protein, dessen alte Bezeichnung *yggX* war. Zu seiner Funktion in *P. aeruginosa* liegen keine weiteren Daten vor.

Zu den mit am stärksten gebildeten Proteinen gehören das Chaperon GroEL, der Elongationsfaktor Ts (Tsf), das ribosomale Protein L25, die mögliche Peroxidase Tsa, die Superoxid-Dismutase SodB, Untereinheiten der Succinyl-CoA-Synthase SucCD und die beta Untereinheit der ATP-Synthase AtpA (s.Tab.19 und Abb.34).



**Abb.34: Die von *P. aeruginosa* Wildtyp bei verschiedenen Wachstumsbedingungen in AB-Medium am stärksten gebildete Proteine.** Es wurden jeweils 700 µg Protein in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 10%-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung visualisiert. Das Proteinmuster (rot) von aerob wachsenden Zellen wurde mit dem Proteinmuster (grün) von anaerob wachsenden Zellen verglichen. Die am stärksten gebildeten Proteine, welche erfolgreich identifiziert werden konnten sind umkreist und mit ihrem Namen beschriftet.

Wie schon im Proteinmuster (Abb. 34) zu erkennen ist, zeigen auch die RE-Werte (Tab.19), dass es sich hierbei um Proteine handelt, welche in der Zelle in größeren Mengen synthetisiert werden. Bedingt durch die hohe Produktion und ihrer grundlegenden Funktion in der Zelle, mit Ausnahme von TsaA und SodB, werden diese Proteine auch „housekeeping proteins“ genannt.

### 3.1.4.4 Vergleich der Proteinmuster von *P. aeruginosa* –Zellen aus LB-Medium mit Minimalmedium AB

Der Unterschied zwischen Vollnährmedium LB und Minimalmedium AB zeigte sich nicht nur in den anaerob durchgeführten Wachstumskurven (Abb.32) von *P. aeruginosa*, sondern auch in den dazugehörigen Proteinmustern der Zellen. Bei dem Übereinanderlegen der Gele mit den anaeroben Zuständen beider Medien, konnten einige unterschiedlich gebildeten Spots detektiert werden. In folgender Abbildung sind die erfolgreich identifizierten Proteine im Gel dargestellt und die anschließende Tabelle beinhaltet die Eigenschaften dieser Proteine.

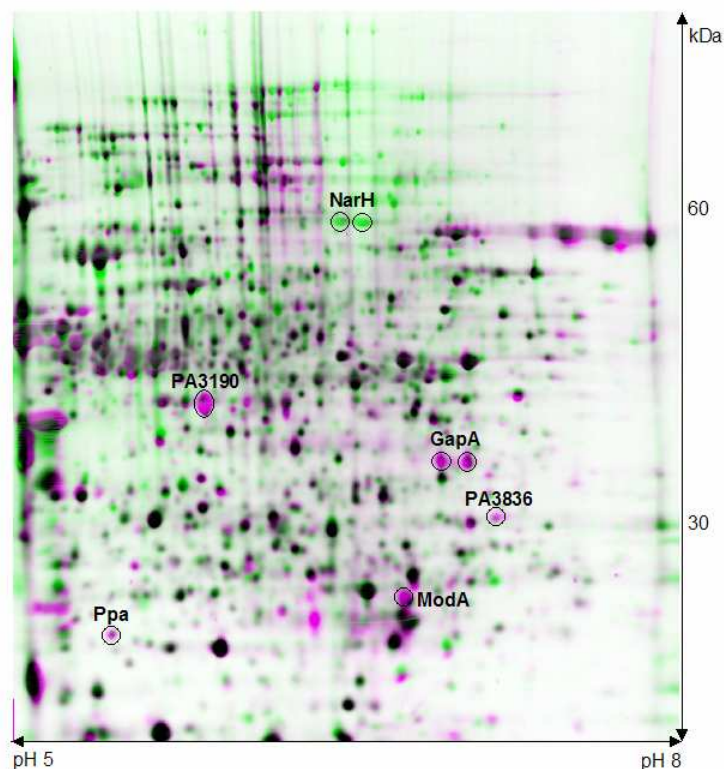


Abb.35: **Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtyp-Zellen in verschiedenen Medien (AB und LB).** Es wurden jeweils 700 µg Protein in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 10%-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung visualisiert. Das Proteinmuster (rot) vom AB-Medium wurde mit dem Proteinmuster (grün) vom LB-Medium verglichen. Erfolgreich identifizierte, unterschiedliche Proteine wurden eingezeichnet.

**Tab.20: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps in AB-Medium im Vergleich zum LB-Medium unterschiedlich synthetisiert wurden.** Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die PA-Nummer, die Bezeichnung, die Funktion und der Induktionsfaktor DE-Werte angegeben.

| PA   | Protein | Name  | Funktion            | DE        |
|------|---------|---|---------------------|-----------|
| 3874 | NarH    | respiratorische Nitratreduktase (beta chain)                  | Energiestoffwechsel | 0,665     |
|      | NarH    |   |                     | 0,193     |
| 3190 | GltB    | probl. Komponente des Bindeprotein des ABC Zuckertransporters | Putatives Enzym     | 14,865    |
| 4031 | Ppa     | Inorganische Pyrophosphatase                                  | Zentralstoffwechsel | 3,779     |
| 3195 | GapA    | Glyceraldehyd- 3-phosphat-Dehydrogenase                       | Energiestoffwechsel | 16,275    |
|      | GapA    |   |                     | 10,939    |
| 3836 |         | hypothetisches Protein  |                     | nur in AB |
| 1863 | ModA    | periplasmatisches Molybdat-Bindeprotein                       | Transport           | 8,401     |

Nur die NarH-Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase zeigte im LB-Medium eine 1,5-fache, bzw. 5,2-fache Induktion im Vergleich zum AB-Medium. Im Gegensatz dazu sind die anderen sechs Proteine im Minimalmedium AB deutlich stärker induziert.

Die bis zu 16,3-fach erhöhte Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GapA ist involviert in den Abbau von Glukose zu Pyruvat. Weiterhin ist das putative Protein GltB (PA3190), welches wahrscheinlich als Komponente des Bindeproteins eines ABC-Transporters für den Zuckertransport fungiert, ebenfalls sehr stark induziert (14,9-fach). Das verdeutlicht, dass im Gegensatz zum LB-Medium, welches komplexe Substanzen wie Hefeextrakt und Trypton enthält, im AB-Medium Glukose die einzige C-Quelle für *P. aeruginosa* ist.

Das im Minimalmedium 3,8-fach induzierte Protein Ppa, die anorganische Pyrophosphatase, ist ein ubiquitär in der Natur vorkommendes Enzym, welches eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus und bei biosynthetischen Reaktionen, z.B. Protein-, RNA- und DNA-Synthese, spielt. Dabei ist Ppa verantwortlich für die Hydrolyse von Pyrophosphat (PPi), welches als Produkt bei vielen biosynthetischen Reaktionen, welche ATP verbrauchen, anfällt. Da im Minimalmedium nur die nötigsten Nährstoffe enthalten sind, müssen die Zellen viele Substanzen selbst synthetisieren. Durch die verstärkten biosynthetischen Reaktionen steigt auch der Bedarf an Ppa.

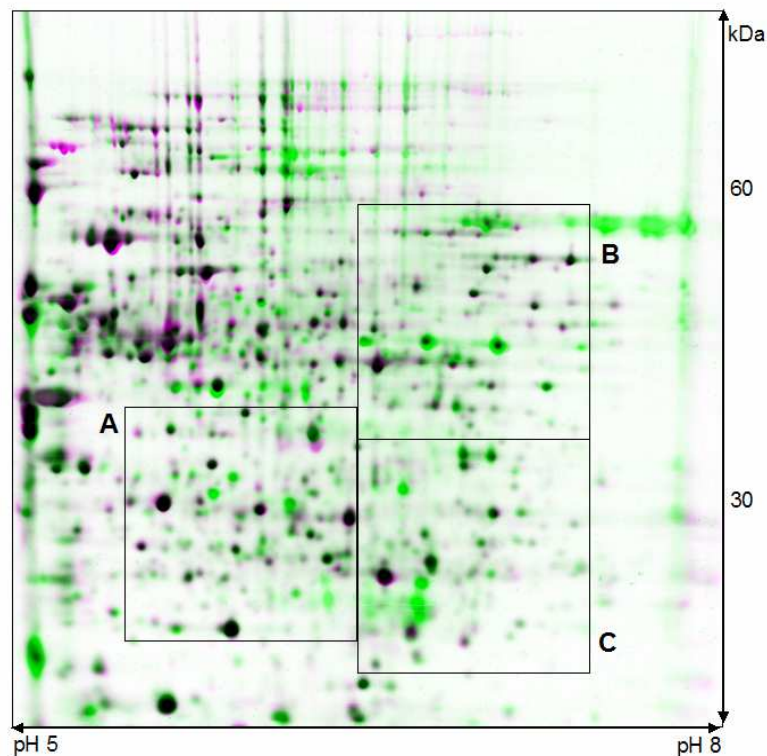
Das Molybdän-Bindeprotein ModA zeigt ebenfalls eine erhöhte Induktion im AB-Medium (8,4-fach). Da die Expression von *modA* unter Molybdän-limitierenden Bedingungen

erhöht wird (Rech *et al.*, 1995), besteht vermutlich im AB-Medium, im Vergleich zum Vollnährmedium LB, ein Mangel an Molybdän-Ionen.

Das hypothetische Protein PA3836 wird ausschließlich im Minimalmedium gebildet. Über seine Funktion liegen noch keine Erkenntnisse vor.

### 3.1.4.5 Statistische Auswertungen der Verteilung von unterschiedlich gebildeten Proteinen im 2D-Gel

Mit Hilfe der Computerprogramme Z3 der Firma Compugen und JVirGel von Karsten Hiller (Hiller, 2003) wurde der Vergleich beider Zustände, aerob und anaerob im Minimalmedium, statistisch ausgewertet. Als erstes wurden in dem übereinander gelegten (gematchten) Bild drei gleich große Rechtecke ausgewählt (s.Abb.36) und von jedem Rechteck mit Hilfe des Z3-Programmes die Anzahl der detektierten Proteine bestimmt. Damit die Wahrscheinlichkeit von überlagerten Proteinen so gering wie möglich gehalten wird, wurden Bereiche gewählt, in denen eine deutliche Auftrennung sichtbar war.



**Abb.36: Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtyp bei verschiedenen Wachstumsbedingungen in AB-Medium.** Das Proteinmuster (rot) von aerob wachsenden Zellen wurde mit dem Proteinmuster (grün) von anaerob wachsenden Zellen verglichen. Die drei gleich großen Rechtecke A, B und C wurden hinsichtlich der Verteilung von induzierten Proteinen statistisch ausgewertet.

Von allen drei Rechtecken wurde die Anzahl der detektierten Proteine bestimmt und eine Auswertung der Induktionen, die sogenannte Matchstatistik, durchgeführt. Diese beinhaltet Angaben über die prozentuale Anzahl aller hochregulierten und reprimierten Proteine, aller nicht regulierten Proteine und derer, die nur unter einem Zustand synthetisiert wurden. In folgender Tabelle sind diese Daten für die drei Rechtecke A, B und C zusammengefasst.

**Tab.21: Statistische Auswertung von aerob und anaerob induzierten Proteine im Minimalmedium. Die Auswertung berücksichtigt nur die Daten der drei gleich großen Rechtecke A, B und C (Abb.36).**

| Rechteck                             | A    | B    | C    | Mittelwert  |
|--------------------------------------|------|------|------|-------------|
| Anzahl der Proteine im anaeroben Gel | 174  | 141  | 198  |             |
| Anzahl der Proteine im aeroben Gel   | 153  | 105  | 151  |             |
| unregulierte Proteine in %           | 56,5 | 56,5 | 47,8 | <b>53,6</b> |
| anaerob hochregulierte Proteine in % | 9,7  | 14,7 | 12,2 | <b>12,2</b> |
| nur anaerob vorhandene Proteine in % | 12,5 | 14,1 | 16,1 | <b>14,2</b> |
| aerob hochregulierte Proteine in %   | 6,5  | 5,5  | 10   | <b>7,3</b>  |
| nur aerob vorhandene Proteine in %   | 14,8 | 9,2  | 13,9 | <b>12,6</b> |

Die Daten zeigen, dass ca. die Hälfte (53,6%) der gebildeten Proteine im Minimalmedium sowohl aerob als auch anaerob vorhanden sind und keine Veränderung in ihrer zellulären Konzentration erfahren. Desweiteren werden 26,4% der Proteine unter anaeroben und 19,9% unter aeroben Bedingungen induziert, bzw. neu synthetisiert.

Abschließend wurde mit Hilfe des Programms JVirGel die Anzahl aller theoretisch möglichen Proteine bestimmt. Das Programm kann alle 5573 von *P. aeruginosa* synthetisierte Proteine, anhand ihres theoretischen pI-Wertes und Molekulargewichtes, in einem virtuellen 2D-Gel darstellen. Durch die benutzerdefinierte Einstellung beider Parameter (pI und Mw) konnten die Rechtecke A, B und C auf dieses virtuelle Gel übertragen werden. Die theoretischen Daten und die praktisch erzielten Werten sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

**Tab.21: Statistische Auswertung von aerob und anaerob gebildeten Proteine im Minimalmedium.** Die Tabelle beinhaltet die Anzahl der praktisch aufgetrennten Proteine in den drei gleich großen Rechtecke A, B und C (Abb.36) im Vergleich zur Anzahl der theoretisch möglichen Proteine.

| Rechteck                             | A   | B   | C   | Mittelwert |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|------------|
| Anzahl der Proteine im anaeroben Gel | 174 | 141 | 198 | <b>171</b> |
| Anzahl der Proteine im aeroben Gel   | 153 | 105 | 151 | <b>136</b> |
| theoretisch mögliche Proteine        | 552 | 457 | 460 | <b>490</b> |

Von den 490 theoretisch möglichen Proteinen wurden 34,9% unter anaeroben und 27,8% unter aeroben Bedingungen detektiert. Dieser Unterschied spiegelt zu einem die Nachweisgrenze der Methode wieder, Proteine mit geringer Konzentration können noch nicht detektiert werden, und zum anderen aber auch die Tatsache, dass zu einem definierten Zeitpunkt nur ein Teil des Proteoms dargestellt werden kann und nicht alle Proteine jeder Zeit verfügbar sind. Das durch die angewandte Präparation bedingte Fehlen von Membranproteinen im 2D-Gel wurde bei den Berechnungen von JVirGel mit einkalkuliert.

### 3.1.5 Zeitliche Dynamik des Proteinmusters

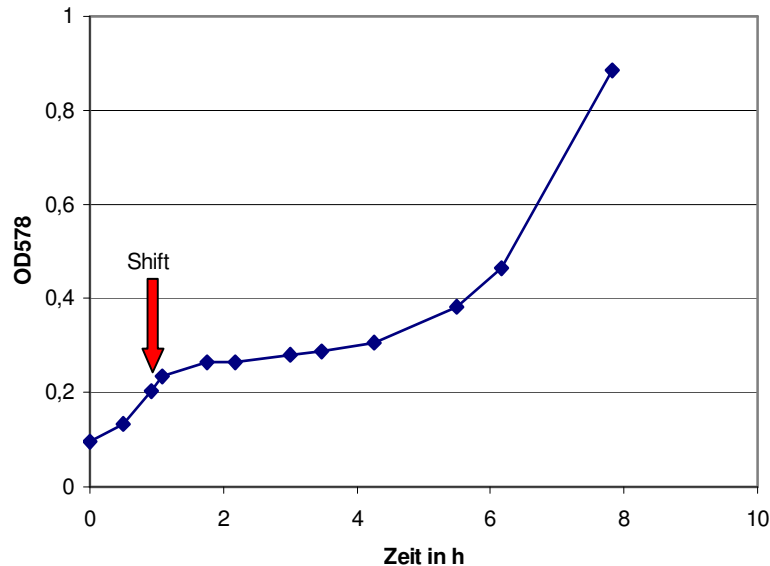
Das Proteinmuster einer Zelle unterscheidet sich nicht nur hinsichtlich verschiedener Umwelteinflüsse (z.B. aerob oder anaerob), sondern auch im Bezug auf das Wachstum. Durch vergleichende 2D-Gelanalysen von Proteinextrakten, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Kultivierung präpariert worden waren, wurde deutlich, dass das Proteinmuster während des Wachstums einer Dynamik unterliegt.

Mit folgendem Ansatz wurden die zeitlichen Veränderungen im Proteinmuster von *P. aeruginosa* während der anaeroben Kultivierung im LB-Medium mit Nitrat untersucht. Sechs parallele Kulturen wurden mit der gleichen Menge der gleichen Bakteriensuspension beimpft, ca. 1 h aerob inkubiert und bei einer OD<sub>578</sub> von 0,2 in Anaerobenflaschen überführt und verschlossen. In Abb.37 ist eine repräsentative Wachstumskurve einer solchen Kultur dargestellt. Zehn Minuten nach dem Wechsel (Shift) von aeroben zu anaeroben Bedingungen bricht das aerob logarithmische Wachstum ab und geht in eine lag-Phase über. An dieser Stelle war der restliche Sauerstoff im Medium verbraucht und ein anaerobes Milieu stellte sich ein. Nach einer fünf stündigen lag-Phase begann *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen logarithmisch zu wachsen (Abb. 37). Alle Kulturen erreichten eine maximale OD<sub>578nm</sub> von ca. 2.

Die sechs identischen Kulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums beendet. Die erste Probe wurde direkt vor dem Shift, bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0,2 geerntet. Hierbei handelt es sich um logarithmisch wachsende Zellen unter aeroben Bedingungen. Die Ernte der Proben 2 und 3 erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der anaeroben lag-Phase und Probe 4 und 5 befanden sich zum Zeitpunkt der Zellernte in der logarithmischen Phase, ebenfalls unter anaeroben Bedingungen. Die letzte Probe (6) wurde nach 24 h geerntet. Die Zellen befinden sich dann in der stationären Phase. Dieser Versuch wurde ein zweites Mal wiederholt, wobei die Zellernten der einzelnen Proben



nicht nach der gleichen Zeit, sondern bei gleicher OD wie im ersten Ansatz, erfolgten. In Tabelle 22 sind die Daten beider Ansätze zusammengefasst.



**Abb.37: Wachstumskurve von PA01 in LB-Medium mit 50 mM Nitrat während eines Wechsels („Shift“) von aeroben zu anaeroben Bedingungen.** Der Zeitpunkt des Shifts ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

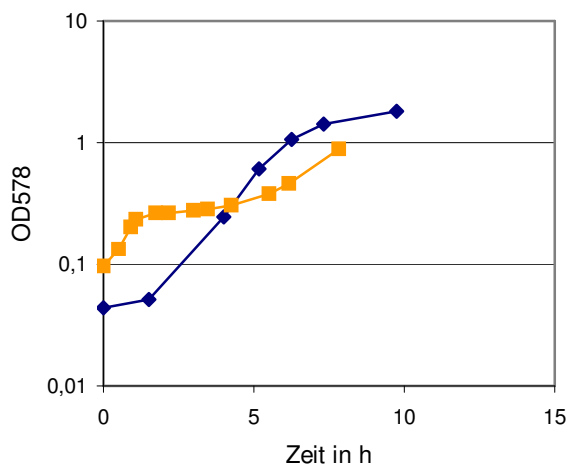
**Tab.22: Zeitpunkte der Zellernten von PA01-Kulturen und dabei gemessene optische Dichten der Proben 1 bis 6 zweier paralleler Ansätze während eines Wechsels von aeroben zu anaeroben Bedingungen.**

| Probe | Ansatz 1      |                   | Ansatz 2      |                   | Bedingung                 |
|-------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------------------|
|       | Zeit in h     | OD <sub>578</sub> | Zeit in h     | OD <sub>578</sub> |                           |
| 1     | Wechsel t = 0 | 0,2               | Wechsel t = 0 | 0,2               | aerob, log-Phase          |
| 2     | 1,25          | 0,278             | 1,66          | 0,283             | anaerob, lag-Phase        |
| 3     | 3,33          | 0,316             | 3,92          | 0,348             | anaerob, lag-Phase        |
| 4     | 5,33          | 0,495             | 4,83          | 0,507             | anaerob, log-Phase        |
| 5     | 7             | 0,915             | 7,08          | 0,963             | anaerob, log-Phase        |
| 6     | 24            | 1,98              | 24            | 2,4               | anaerob, stationäre Phase |

Nach der Herstellung der 2D-Gele wurden jeweils die beiden Gele (Ansatz 1 und 2) der gleichen Probe zu einem RMG-Gel verarbeitet und diese sechs Proteinmuster miteinander verglichen.

In den 2D-Mustern der Proben konnten die meisten der Proteinspots über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg detektiert werden. Allerdings wurde auch deutlich, dass die Proteine der Nitratatmung (NarH, NirB und NirS), sowie die Proteine der Argininfermentation (ArcABC) einer deutlichen Dynamik unterlagen (Abb.39).

Unter aeroben Bedingungen zum Zeitpunkt  $t = 0$  werden die Proteine der Argininfermentation (ArcABC), im Gegensatz zu den Proteinen der Denitrifikation (NarH und NirS), schon im geringen Maße synthetisiert (Abb.39, Bild1). Während der anaeroben lag-Phase (Abb.39, Bild 2 und 3) kommt es dann zu einer starken Induktion der Proteine ArcABC, die hier ihren Höhepunkt erreicht. Diese Induktion verringert sich nach 7 h gegen Ende der logarithmischen Phase (Abb.39, Bild 5) wieder, erreicht aber selbst nach 24 h, während der stationären Phase, nicht den geringsten Level wie unter aeroben Bedingungen (Abb.39, Bild 1). Beim Vergleich der Proteinmuster von Wildtypzellen, welche unter aeroben und denitrifizierenden Bedingungen inkubiert und bei einer  $OD_{578}$  von 0,5, also in der Mitte der logarithmischen Phase, geerntet wurden, ist keine Induktion von ArcABC zu verzeichnen (s.Kapitel 3.1.2). Dies entspricht auch den Untersuchungen von Mercencier *et al.* (1980), dass Nitrat eine Induktion der Proteine der Argininfermentation unter anaeroben Bedingungen verhindert. Die hier beobachtete Induktion von ArcABC während des anaeroben Wachstums ist möglicherweise durch den Versuchsaufbau (Shift) bedingt. In folgender Abbildung ist der Unterschied zwischen einer normalen denitrifizierenden Kultur, wo es zu keiner Induktion der Argininfermentationsproteine kam, und der Shift-Kultur dargestellt.



**Abb.39: Wachstumskurven von PA01 in LB-Medium mit 50 mM Nitrat während eines Wechsels (Shift) von aeroben zu anaeroben Bedingungen (—■—) und einer kontinuierlich unter denitrifizierenden Bedingungen wachsenden Kultur (—■—).**

Nach dem Wechsel einer logarithmisch wachsenden aeroben Kultur zu denitrifizierenden Bedingungen kommt es zu einer längeren lag-Phase (ca. 5 h), in der die Bakterien ihren Stoffwechsel umstellen. Diese Phase dauert nach dem Beimpfen einer anaeroben Kultur mit Zellen aus einer aeroben Stationärphasekultur nicht so lang. Die Zellen fangen hier schon nach einer Umstellungsphase von 2 h das logarithmische Wachstum an.

Die Daten der Denitrifikationsproteine NarH und NirS zeigen, dass während der langen lag-Phase in der Shift-Kultur keine Denitrifikation stattfindet. Die Untereinheit der Nitratreduktase NarH, welche in den ersten Schritt der Denitrifikation involviert ist, konnte

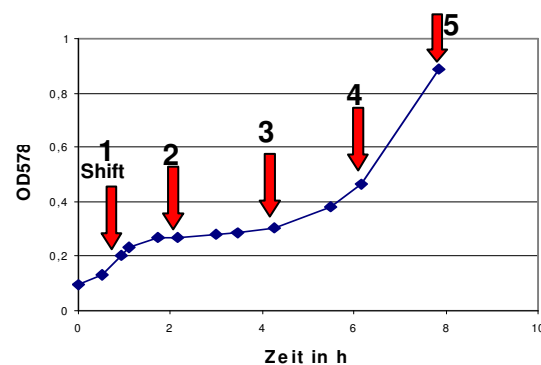
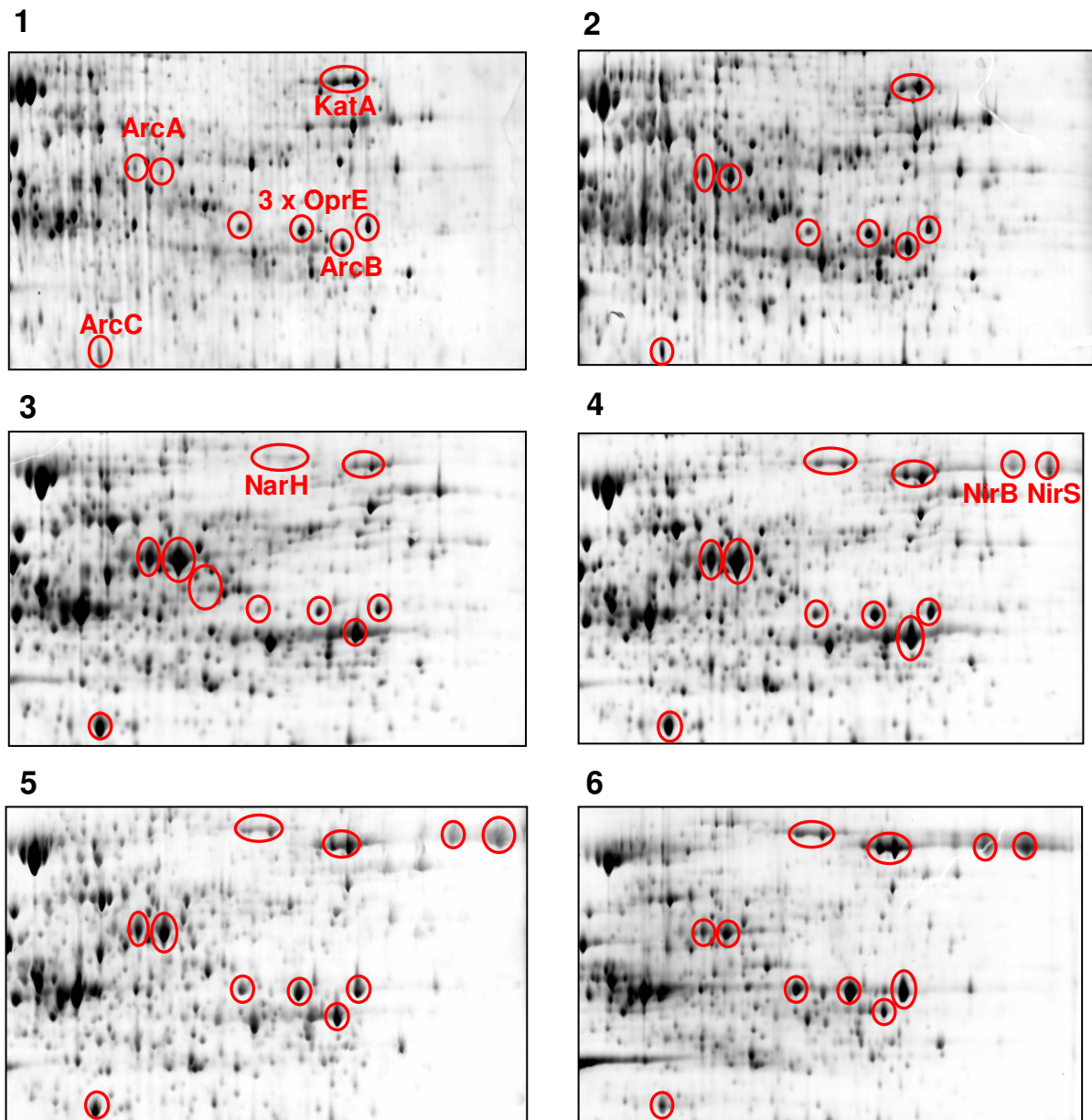
bis 1,5 h nach dem Shift (Abb.39, Bild 2) nicht nachgewiesen werden. Das erste Mal war die NarH-Untereinheit nach 3,5 h im Gel sichtbar, zum gleichen Zeitpunkt, bei welchen die lag-Phase in die logarithmische Phase übergeht. Auch die Nitritreduktase NirS war vor 4 h im 2D-Gel nicht detektierbar (Abb.39, Bild 4).

Möglicherweise nutzt *P. aeruginosa* während der langen lag-Phase nach dem Shift von aeroben zu anaeroben Bedingungen, in der keine Denitrifikation stattfinden kann, die Argininfermentation, um Energie für das Überleben zu gewinnen. Dies würde die starke Induktion der Proteine nach dem Shift erklären.

Da während der Argininfermentation aber pro mol Arginin nur 1 ATP gebildet wird, kommt es nicht zu einem starken Wachstum. Erst nach der Bildung der nötigen Enzyme der Denitrifikation, wird Nitrat veratmet und *P. aeruginosa* geht in die logarithmische Wachstumsphase über.

In der kontinuierlichen anaeroben Kultur können zum Zeitpunkt der Zellernte beide Denitrifikationsproteine im 2D-Gel nachgewiesen werden (Abb.23). Das bestätigt, dass die Verwertung von Nitrat die Induktion der Proteine der Argininfermentation unter anaeroben Bedingungen verhindert (Mercencier *et al.*, 1980).

Die Synthese anderer Proteine, wie z.B. KatA und OprE, unterliegt keiner solchen starken Dynamik während des Wachstums. Während der anaeroben logarithmischen Phase kommt es zu einer geringen Zunahme von OprE, welches in der stationären Phase am sein Maximum erreicht. KatA hingegen zeigt nur in der stationären Phase eine schwache Induktion.



**Abb.39:** Ausschnitte aus den Proteinmustern von PAO1 zu sechs verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums bei einem Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen. Die Zahlen 1 bis 5 über den einzelnen Ausschnitten spiegeln die Beschriftungen der roten Pfeile in der Wachstumskurve wieder. Die Zellen mit dem Proteinmuster Bild 6 wurden nach 25 h bei einer OD<sub>578</sub> 1,98 geerntet. Mit roten Kreisen sind die beobachteten Proteine markiert.

### 3.1.6 Analyse des Proteoms von PA09104, einer *narL*-Mutante von *P. aeruginosa*, unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB

NarXL ist ein Zweikomponenten-Regulationssystem, dessen Sensor NarX in der Membran sitzt und bei Vorhandensein von Nitrat in der Umgebung sich selbst phosphoryliert. Dieses autophosphorylierte NarX überträgt seine Phosphatgruppe anschließend auf den Transkriptionsregulator NarL, der dadurch in der Lage ist, an DNA zu binden (Stewart, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass in *P. aeruginosa* die divergent zu *narXL* orientierten Gene *narK1K2GHJI* der dissimilatorischen Nitratreduktase, ein Operon bilden und gemeinsam reguliert und transkribiert werden. Auch die *nirQ*-Expression (Regulatorgen) ist ebenfalls NarL-abhängig (Krieger, 2001). Auf die Expression der Strukturgene *nirS* und *norCB* scheint das Regulationssystem jedoch keinen Einfluss zu haben (Krieger, 2001). Um die Auswirkungen von NarL-abhängigen Genen während der Denitrifikation auf das Proteom zu untersuchen, wurde das Proteinmuster des Wildtyps mit dem der *narL*-Mutante PA09104 verglichen.

Um die Wachstumsphänotypen beider Stämme miteinander zu vergleichen, wurden *P. aeruginosa* Wildtypzellen und Zellen der *narL*-Mutante in LB-Medium unter denitrifizierenden Bedingungen kultiviert und ihr Wachstum spektroskopisch verfolgt (Abb.40). Wie die Wachstumskurve zeigt, wächst die Nitratreduktasemutante nur noch sehr schlecht und erreicht nach 24 Stunden eine OD<sub>578</sub> von 0,268, während der Wildtyp in gleicher Zeit eine OD<sub>578</sub> von 1,96 erreicht.

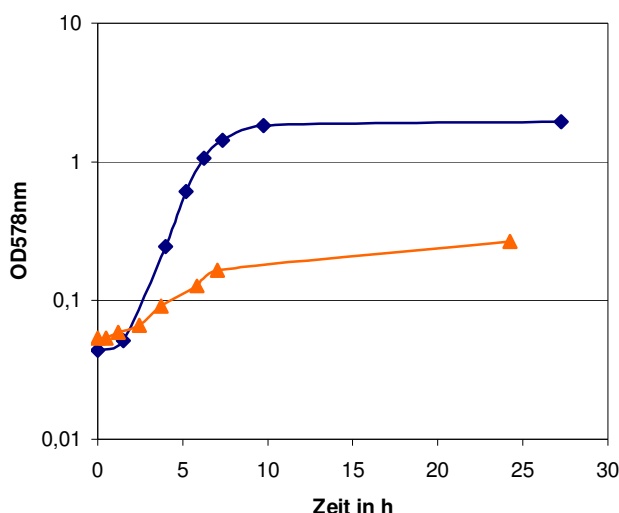


Abb.40: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 (—■—) und der *narL*-Mutante PA09104 (—▲—) unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit Nitrat als Elektronenakzeptor.

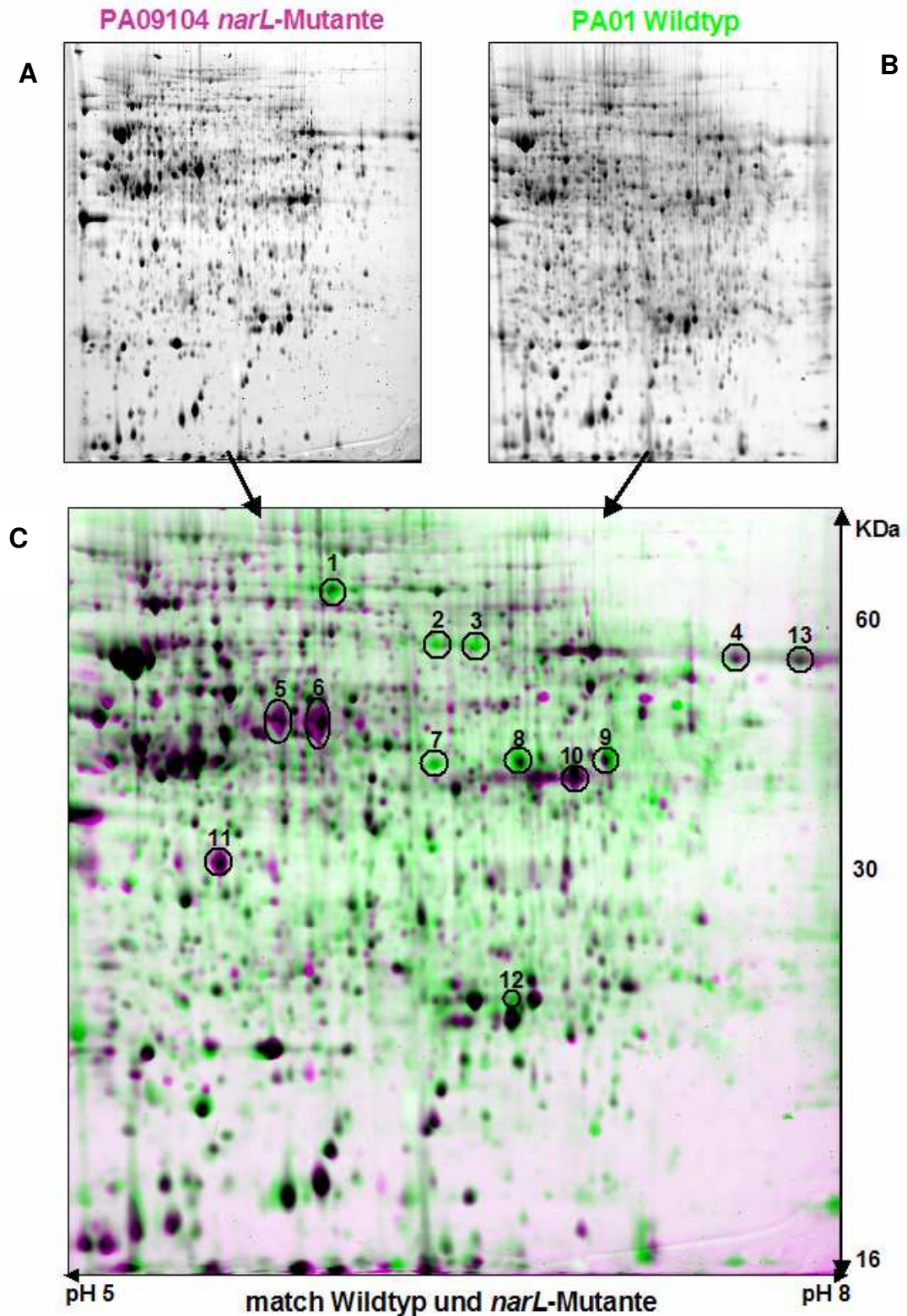
Aufgrund des schlechten Wachstums der *narL*-Mutante unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat konnten beide Kulturen, Wildtyp und Mutante, nicht bei gleicher OD<sub>578</sub> von 0,5 geerntet werden. Die Zellernte der Mutantenzellen erfolgte nach 7 h bei einer OD<sub>578</sub> von 0,166. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt. In folgender Tabelle sind alle Daten der Probenerstellung und -bearbeitung zusammengefasst.

**Tab.23: Wachstumsbedingungen der *P. aeruginosa* Wildtypkultur und *narL*-Mutant unter anaeroben Bedingungen**

| Bedingung                     | Wildtyp PAO1 /<br><i>narL</i> -Mutante<br>(PAO9104) |
|-------------------------------|---|
| Medium                        | LB  |
| e-Akzeptor                    | Nitrat<br>(50 mM KNO <sub>3</sub> )                 |
| OD <sub>578nm</sub> Zellernte | 0,5 / 0,14  |
| Aufgetragene Proteinmenge     | 510 µg  |
| pH-Gradienten                 | 5 – 8   |
| Polyacrylamidkonz.            | 12%   |

Bei der digitalen Bildanalyse legt das Programm Z3 die miteinander zu vergleichenden Gele übereinander, wobei die Spots in dem Gel der *narL*-Mutante rot und im Wildtyp-Gel grün eingefärbt werden. In folgender Abbildung sind zuerst die beiden einzelnen Proteinmuster des Wildtyps (Bild B) und der Mutante (Bild A) dargestellt. Nach dem Übereinanderlegen beider Bilder entstand das Bild C (Abb.41).





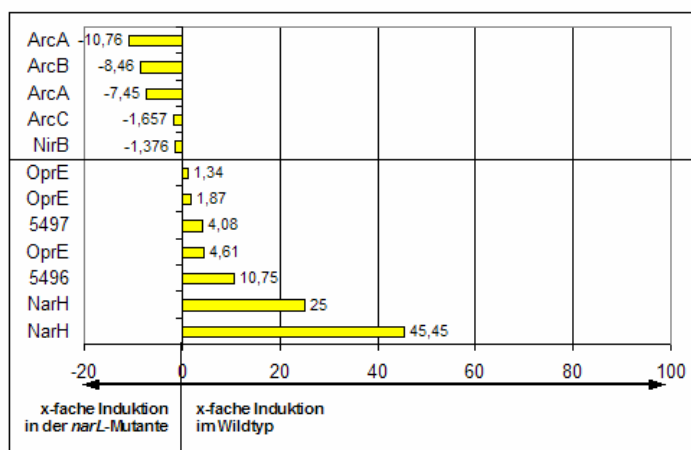
**Abb.41: Vergleich der Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtypzellen und Zellen der *narL*-Mutante (PAO9104) unter denitrifizierenden Bedingungen in LB-Medium.**

Es wurden jeweils 510 µg Protein in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 12 %-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung visualisiert. A: Proteinmuster von *narL*-Mutanten-Zellen, B: Proteinmuster von Wildtypzellen, C: Überlagerung beider Gele, wobei Bild A in rot und Bild B in grün dargestellt sind. Identische Proteinmengen führen bei der Überlagerung zu schwarzen Proteinflecken.

**Tab.24: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps und der *narL*-Mutante in LB-Medium unter denitrifizierenden Bedingungen induziert wurden.** Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb. 41), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein  | pl theor. | Mw theor. | RE Wildtyp  | RE <i>narL</i> -Mut. | DE           |
|----|------|--|-----------|-----------|-------------|----------------------|--------------|
| 1  | 5497 | hypothetisches Protein                             | 5,67      | 82,71     | 3173        | 676                  | <b>0,25</b>  |
| 2  | 3874 | NarH respiratorische Nitratreduktase (beta chain)  | 5,71      | 58,08     | 1459        | 51                   | <b>0,04</b>  |
| 3  |      | NarH   |           |           | 2515        | 55                   | <b>0,02</b>  |
| 4  | 1781 | NirB Assimilatorische Nitritreduktase (große UE)   | 6,32      | 89,67     | 1321        | 1582                 | <b>1,38</b>  |
| 5  | 5171 | ArcA Arginin-Deiminase                             | 5,37      | 46,41     | 661         | 7109                 | <b>10,76</b> |
| 6  |      | ArcA   |           |           | 2938        | 21877                | <b>7,45</b>  |
| 7  | 0291 | OprE Anaerob induziertes Porin der äußeren Membran | 8,93      | 49,64     | 2914        | 549                  | <b>0,22</b>  |
| 8  |      | OprE   |           |           | 2784        | 1811                 | <b>0,75</b>  |
| 9  |      | OprE   |           |           | 5133        | 2385                 | <b>0,53</b>  |
| 10 | 5172 | ArcB katabolische Ornithin-Carbonyltransferase     | 6,12      | 38,09     | 1532        | 12963                | <b>8,46</b>  |
| 11 | 5173 | ArcC Carbamatkinase                                | 5,02      | 33,06     | 6831        | 9848                 | <b>1,66</b>  |
| 12 | 5496 | hypothetisches Protein                             | 5,96      | 24,86     | 4846        | 392                  | <b>0,09</b>  |
| 13 | 0519 | NirS Nirritreduktase                               | 6,32      | 89,67     | Keine Daten |                      |              |

In Abbildung 42 sind die Ergebnisse des Proteomvergleiches von Wildtyp und *narL*-Mutante in einem Diagramm zusammengefasst. Auf der X-Achse sind die einzelnen DE-Werte aufgetragen, wobei negative Werte für eine Induktion in der Mutante stehen und positive Werte für eine Induktion im Wildtyp.



**Abb. 42: Zusammenfassende Darstellung der DE-Werte der beim Vergleich von Wildtyp und *narL*-Mutante untersuchten Proteine.** Auf der X-Achse sind die einzelnen DE-Werte aufgetragen, wobei negative Werte für eine Induktion in der Mutante stehen und positive Werte für eine Induktion im Wildtyp.



Acht von den dreizehn in Tabelle 24 beschriebenen Proteinen werden im Wildtyp und in der *narL*-Mutante signifikant unterschiedlich gebildet.

Dazu gehört unter anderem die Untereinheit der dissimilatorischen Nitratreduktase NarH (Protein-Nr.2 und 3). Die Analyse beider Proteinmuster zeigte, dass NarH in der *narL*-Mutante kaum gebildet wurde. Im Vergleich zum Wildtyp erfolgte in der Mutante eine 25-fache (DE= 0,04), bzw. 45,5-fache (DE=0,02) Reduzierung.

Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass in *P. aeruginosa* die Transkription der Gene *narK1K2GHIJ* der dissimilatorischen Nitratreduktase in Abhängigkeit von Nitrat durch NarXL positiv reguliert wird (Krieger, 2001). Fehlt der Regulator NarL wird die Transkription der Gene reprimiert und weniger Protein gebildet. Laut PRODORIC-Datenbank ([www.prodoric.de](http://www.prodoric.de)) befinden sich im Promotorbereich von *narK1K2GHIJ* drei NarL-Bindestellen.

Neben diesen drei Bindestellen wurden bis jetzt nur noch zwei weitere NarL-Bindestellen in *P. aeruginosa* beschrieben. Beide befinden sich im Promotorbereich von *hema* (Krieger *et al.*, 2002).

Durch theoretische Analysen dieser fünf verschiedenen experimentell untersuchten NarL-Bindemotive aus *P. aeruginosa* konnte wie auch schon bei Anr eine DNA Matrix für diese Bindestelle abgeleitet werden (PRODORIC-Datenbank). Im Vergleich zur palindromen Konsensussequenz (14 Aminosäuren) von Anr bzw. Dnr, besteht die Erkennungssequenz von NarL aus nur 7 direkt aufeinander folgenden Aminosäuren. Bedingt durch die kurze Aminosäuresequenz, konnten im Genom von *P. aeruginosa*, in einem Bereich von 350 bp vor einem translationalen Startcodon, mittels bioinformatischer Analysen 15626 potentielle Bindestellen detektiert werden. Aufgrund dieser enormen Anzahl erscheint eine Vorhersage von möglichen Bindestellen im Falle von NarL nicht sinnvoll.

Die Proteine der Argininfermentation ArcA (Protein-Nr. 5 und 6) und ArcB (Protein-Nr. 10) werden in der *narL*-Mutante deutlich stärker gebildet als im Wildtyp.

Anhand des Wachstumsphänotypes der *narL*-Mutante unter denitrifizierenden Bedingungen (Abb.40) und der Tatsache, dass die Nitratreduktase in der Mutante deutlich weniger gebildet wird, kann man davon ausgehen, dass die *narL*-Mutante keine Nitratatmung durchführen kann. Das noch zu verzeichnende geringe anaerobe Wachstum in LB-Medium ist demnach auf die Argininfermentation zurückzuführen, welche als alternativer Stoffwechselweg von *P. aeruginosa* zum Überleben genutzt wird. Beide Proteine, ArcA und ArcB zeigten eine deutliche Induktion im Proteinmuster der Mutante. Die DE-Werte betragen 7,45, bzw. 10,76 und 8,46 (Tab.24). Das dritte Protein ArcC

(Protein-Nr. 11) zeigt ebenfalls eine geringe, jedoch nicht signifikante, Induktion (DE=1,66).

Obwohl nur einer der drei OprE-Proteinflecken (Protein-Nr. 7) in der Mutante signifikant herabgesetzt wird (4,6-fach), zeigen die beiden anderen Proteinflecken (Nr. 8 und 9) ebenfalls eine schwächere Synthese (Tab.24). Die physiologische Funktion des anaerob induzierten Proteins OprE ist bisher noch unbekannt, auch seine Regulation ist noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen von Yamano *et al.* (1998) haben ergeben, dass der alternative Sigma Faktor RpoN, neben anderen, bis jetzt noch unbekannten regulatorischen Proteinen, an der Regulation beteiligt ist. Aufgrund der reduzierten Synthese von OprE in der *narL*-Mutante könnte einer dieser unbekannten Regulatoren möglicherweise NarL sein.

Neben diesen bekannten Proteinen, wurden auch zwei hypothetische Proteine in der Mutante im geringeren Maße synthetisiert. Hierbei handelt es sich um PA5496 (Protein-Nr. 12) und direkt in gleicher Leserichtung im Genom folgend PA5497 (Protein-Nr.1). Dass beide durch NarL induziert werden (10,75-fach und 4-fach), verstärkt die Vermutung, dass ihre Transkription möglicherweise gemeinsam in einem Operon erfolgt.

Ein Gene-Alignent mit der TIGR-Datenbank ergab für PA5496 eine 49,3%-ige Ähnlichkeit zu einer Ribonucleotid-Reduktase von *Halobacterium* sp. NRC-1. In der PRODORIC-Datenbank wird für PA5497 eine 41,7%-ige Ähnlichkeit ebenfalls zu einer Ribonucleotid-Reduktase in *Sulfolobus solfataricus* angegeben. Ribonucleotid-Reduktasen katalysieren die Reduktion von Ribonucleotiden zu ihren korrespondierenden Desoxyribonucleotiden.

Die assimilatorischen Nitritreduktase NirB (Protein-Nr. 4) zeigte keine veränderte Induktion (DE=1,38), beim Vergleich von Wildtyp und *narL*-Mutante, ebenso die dissimilatorische Nitritreduktase NirS (Protein-Nr.13). Da beide Reduktasen Nitrit umsetzen liegt es nahe, dass das Zweikomponenten-Regulationssystem NarXL, dessen Sensor NarX in der Membran sitzt und auf das Vorhandensein von Nitrat in der Umgebung reagiert, nicht an der Regulation während der Umsetzung von Nitrit beteiligt ist. Untersuchungen von Promotoraktivitäten konnten ebenfalls zeigen, dass NarXL auf die Expression der Strukturgene *nirS* und *norCB* keinen Einfluss hat (Krieger, 2001).

Bei der Untersuchung der *narL*-Mutante PA09104 wurde deutlich, dass ohne funktionierendes Nitratsensor-System (NarXL) die Synthese der Nitratreduktase NarGHJL stark reduziert wird und stattdessen die Proteine der Argininfermentation (ArcABC) verstärkt gebildet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Transkription drei weiterer Gene (*oprE*, PA5496 und PA5497) ebenfalls von NarL beeinflusst wird.

Da Anr und Dnr an der anaeroben Regulation der *narXL*-Aktivierung beteiligt sind (Krieger, 2001), wird eine mögliche Regulation der entsprechenden Gene im Zusammenhang mit den folgenden Proteomanalysen der *anr*-, *dnr*- und *anr*-Mutante mit *dnr*-Gen (pHA541) im Kapitel 3.1.8.1 und 3.1.8.2 ausführlich diskutiert.

### 3.1.7 Analyse des Proteoms von RM536, einer *dnr*-Mutante von *P. aeruginosa*, unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB

Ein wichtiger Regulator der Denitrifikation in *P. aeruginosa* ist Dnr („dissimilatory nitrate respiration regulator“). Er erkennt die gleiche DNA-Konsensussequenz wie Fnr und Anr. Dem Protein fehlt jedoch das N-terminale Cysteincluster für die Bildung des Fe-S-Zentrums (Arai *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Denitrifikationsgene (*nirS* und *norC*) über eine Anr-Dnr-Kaskade reguliert werden. Dabei nimmt Anr Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes wahr und aktiviert die Transkription von *dnr*. Dnr wiederum reagiert vermutlich auf N-Oxide und aktiviert die Transkription der entsprechenden Zielgene (Arai *et al.*, 1997).

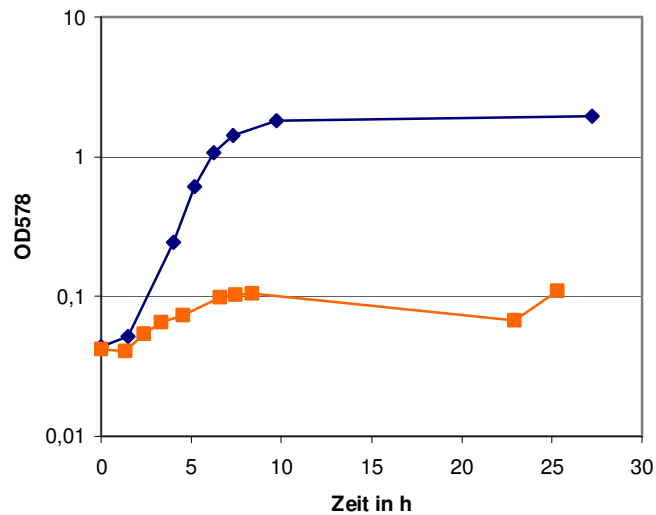
Um den Einfluss von Dnr auf das Proteom von *P. aeruginosa* unter denitrifizierenden Bedingungen zu untersuchen, wurden die 2D-Gele vom PA01 Wildtyp mit denen der *dnr*-Mutante (RM536) verglichen. Zunächst wurden die Bakterien unter folgenden Wachstumsbedingungen inkubiert, geerntet und Proteine für die 2D-Gel-Analysen präpariert.

**Tab.25: Wachstumsbedingungen der *P. aeruginosa* Wildtypkultur und *dnr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen**

| Bedingung                     | Wildtyp PA01 /<br><i>dnr</i> -Mutante (RM536) |
|-------------------------------|---|
| Medium                        | LB  |
| e-Akzeptor                    | Nitrat<br>(50 mM KNO <sub>3</sub> )           |
| OD <sub>578nm</sub> Zellernte | 0,5 / 0,1                                     |
| Aufgetragene Proteinmenge     | 700 µg  |
| pH-Gradienten                 | 5 - 8   |
| Polyacrylamidkonz.            | 10%   |

Unter den eben beschriebenen Bedingungen konnten von PA01 Wildtyp und der *dnr*-Mutante die in folgender Abbildung (Abb.43) dargestellten Wachstumskurven aufgenommen werden. Wie schon bei der *narL*-Mutante beobachtet wurde, wächst auch die *dnr*-Mutante kaum mit Nitrat als Elektronenakzeptor unter anaeroben Bedingungen. Innerhalb von 24 h wächst die *dnr*-Mutante nur auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1, der Wildtyp

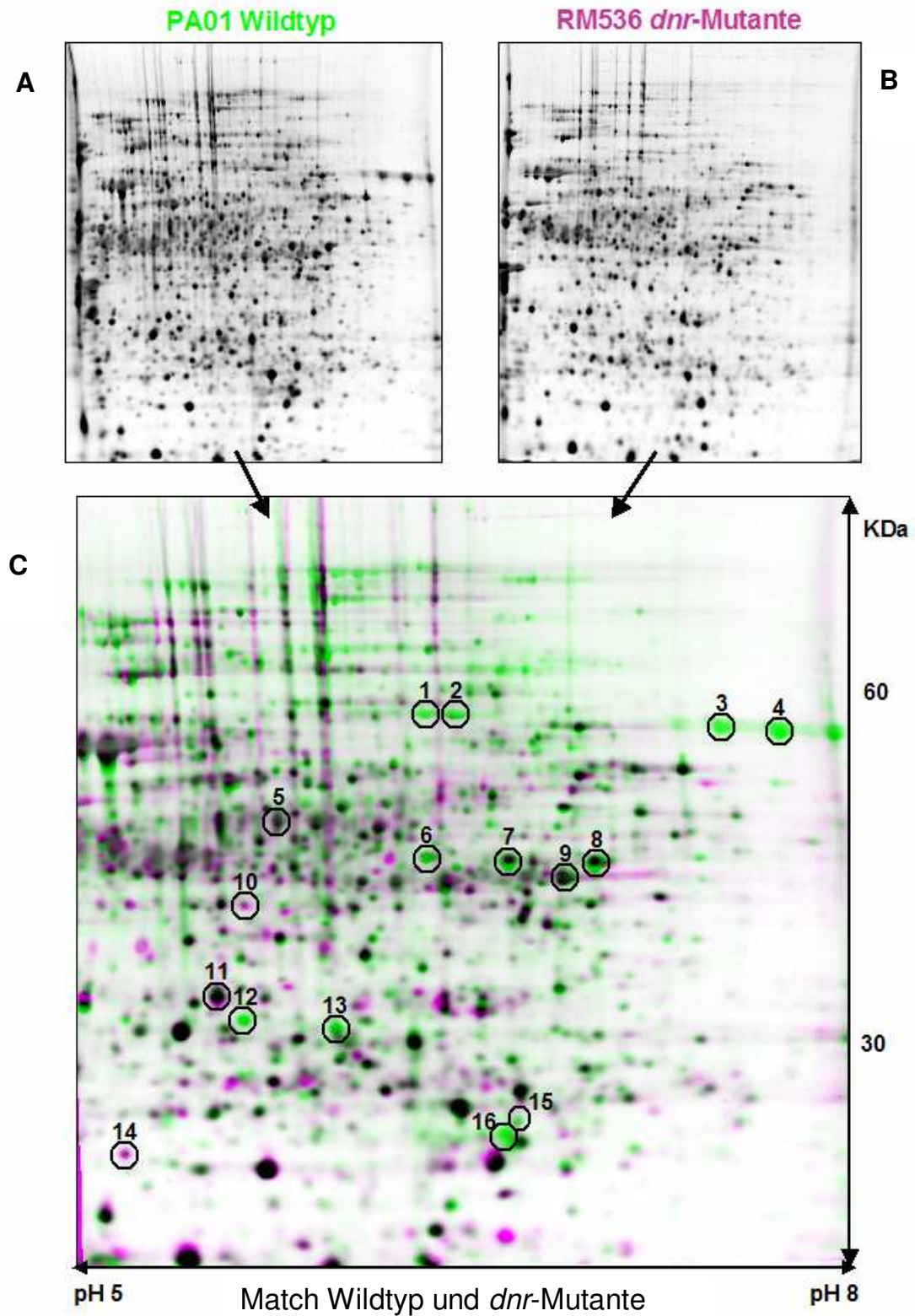
hingegen erreicht eine  $OD_{578}$  von 2,0. Aus diesem Wachstumsverhalten kann geschlossen werden, dass das Regulatorprotein Dnr essentiell für die Denitrifikation ist.



**Abb.43: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* Wildtyp (PA01) (—■—) und der *dnr*-Mutante RM536 (—□—) unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor.**

Die Zellernte zweier paralleler Kulturen erfolgte auch hier nach 7 h bei einer  $OD_{578}$  von 0,1. Die extrahierten Proteine wurden in einem pH-Bereich zwischen 5 und 8 isoelektrisch fokussiert, in einem 10%-igem SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht getrennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff RuBPS sichtbar gemacht.

Bei der digitalen Bildanalyse legt das Programm Z3 die miteinander zu vergleichenden Gele übereinander, wobei die Proteine in dem Gel der *dnr*-Mutante rot und im Wildtyp-Gel grün eingefärbt wurden. In folgender Abbildung sind zuerst die beiden einzelnen Proteinmuster des Wildtyps (Bild A) und der Mutante (Bild B) dargestellt. Nach dem Übereinanderlegen beider Bilder entstand das Bild C (Abb.44).



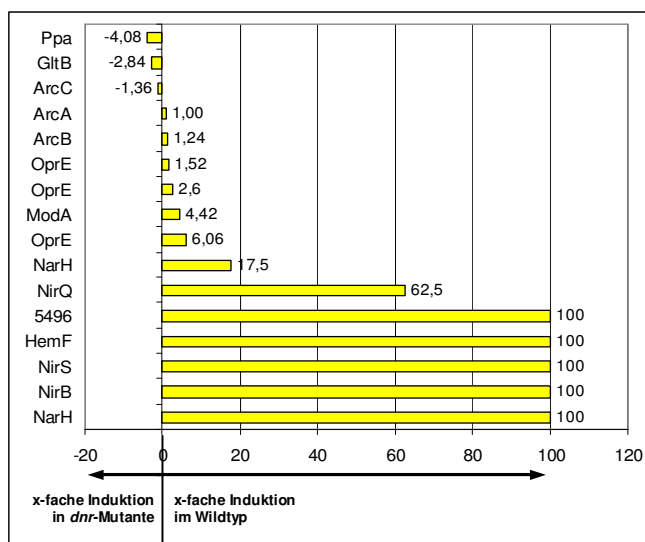
**Abb.44: Vergleich der Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtypzellen und Zellen der *dnr*-Mutante (RM536) unter denitrifizierenden Bedingungen in LB-Medium.**

Es wurden jeweils 700 µg Protein in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 10%-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung visualisiert. A: Proteinmuster von Wildtypzellen B: Proteinmuster von *dnr*-Mutanten-Zellen, C: Überlagerung beider Gele, wobei Bild A in grün und Bild B in rot dargestellt sind. Identische Proteinmengen führen bei der Überlagerung zu schwarzen Proteinflecken.

**Tab.26: Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps und der *dnr*-Mutante in LB-Medium unter denitrifizierenden Bedingungen induziert wurden.** Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb. 44), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein   | pI<br>theor. | Mw<br>theor. | RE<br>Wildtyp | RE <i>dnr</i> -<br>Mutante | DE          |
|----|------|---|--------------|--------------|---------------|----------------------------|-------------|
| 1  | 3874 | NarH respiratorische Nitratreduktase (beta chain)                 | 5,71         | 58,08        | 2859          |                            | -           |
| 2  |      | NarH  |              |              | 4657          | 366                        | <b>0,06</b> |
| 3  | 1781 | NirB Assimilatorische Nitritreduktase (große UE)                  | 6,32         | 89,67        | 3690          |                            | -           |
| 4  | 0519 | NirS Nitritreduktase (precursor)                                  | 8,26         | 62,63        | 8043          |                            | -           |
| 5  | 5171 | ArcA Arginin-Deiminase  | 5,37         | 46,41        | 2819          | 4024                       | <b>1,04</b> |
| 6  | 0291 | OprE anaerob induziertes Porin der äußeren Membran                | 8,93         | 49,64        | 4623          | 1050                       | <b>0,17</b> |
| 7  |      | OprE  |              |              |               |                            | <b>0,66</b> |
| 8  |      | OprE  |              |              | 9124          | 4814                       | <b>0,38</b> |
| 9  | 5172 | ArcB katabolische Ornithin-Carbomyltransferase                    | 6,12         | 38,09        | 5456          | 6043                       | <b>0,81</b> |
| 10 | 3190 | GltB probl. Komponente des Bindepotein des ABC Zuckertransporters | 5,55         | 45,11        | 461           | 1796                       | <b>2,84</b> |
| 11 | 5173 | ArcC Carbamatkinase   | 5,02         | 33,06        | 5621          | 10489                      | <b>1,36</b> |
| 12 | 0520 | NirQ regulatorisches Protein NirQ                                 | 5,13         | 28,88        | 3139          | 69                         | <b>0,02</b> |
| 13 | 0024 | HemF Coproporphorynogen III Oxidase, aerob                        | 5,49         | 34,75        | 3958          |                            | -           |
| 14 | 4031 | Ppa anorganische Pyrophosphatase                                  | 4,78         | 19,38        | 414           | 2323                       | <b>4,08</b> |
| 15 | 1863 | ModA periplasmatisches Molybdat-Bindeprotein (precursor)          | 6,36         | 26,36        | 1114          | 346                        | <b>0,23</b> |
| 16 | 5496 | hypothetisches Protein  | 5,96         | 24,86        | 3080          |                            | -           |

In folgender Abbildung sind die Ergebnisse des Proteomvergleiches von Wildtyp und *dnr*-Mutante in einem Diagramm zusammengefasst (Abb.47).



**Abb.47: Zusammenfassende Darstellung der DE-Werte der beim Vergleich von Wildtyp und *dnr*-Mutante untersuchten Proteine.** Auf der X-Achse sind die einzelnen DE-Werte aufgetragen, wobei negative Werte für eine Induktion in der Mutante stehen und positive Werte für eine Induktion im Wildtyp. Proteine, welche nur in einem Zustand vorkommen werden im Diagramm mit 100-facher Induktion, bzw. Repression dargestellt.

Auf der X-Achse sind die einzelnen DE-Werte aufgetragen, wobei negative Werte für eine Induktion in der Mutante stehen und positive Werte für eine Induktion im Wildtyp. Proteine, welche nur in einem Zustand vorkommen werden im Diagramm mit 100-facher Induktion, bzw. Repression dargestellt.

Von den 16 aufgeführten Proteinen wurden 12 in der Mutante und im Wildtyp signifikant unterschiedlich gebildet. Fünf dieser 12 Proteine konnten im Proteinmuster der *dnr*-Mutante nicht mehr nachgewiesen werden, fünf weitere wurden deutlich weniger gebildet und zwei Proteine erfuhren eine Steigerung.

Zu denen in der Mutante nicht nachweisbaren bzw. stark reduzierten Proteinen gehören vor allen Proteine, welche an der Denitrifikation beteiligt sind (NarH, NirS, HemF und NirQ). Für diese vier Proteine konnte mittels Proteomanalyse eine Abhängigkeit von Dnr gezeigt werden. Da sich in den Promotorbereichen der vier dazugehörigen Gene Anr-Bindestellen befinden (Rompf *et al.*, 1998 [*hemF*], Arai *et al.*, 1991 und 1994 [*nirS* und *nirQ*], Trunk *et al.*, submitted [*narH*]) und Dnr die gleiche Konsensussequenz wie Anr erkennt, kann man von einem direkten Einfluß von Dnr auf die Expression der entsprechenden Gene ausgehen.

Da sowohl die Nitritreduktase NirS als auch die Nitratreduktase-Untereinheit NarH im Proteinmuster der *dnr*-Mutante fehlen, bzw. 17,5-fach (DE = 0,06) reduziert wurde (Tab.26, Protein-Nr.1, 2 und 4), wird deutlich, dass nicht nur die Transkription der Nitritreduktase NirS über Dnr reguliert wird (Arai *et al.*, 1995), sondern auch die Gene der Nitratreduktase NarGHI. Messungen der Promotoraktivität ergaben ebenfalls, dass in der *dnr*-Mutante die *narK<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHJI*-Transkription in Gegenwart von Nitrat unter anaeroben Bedingungen um 65% reduziert wird (Krieger, 2001).

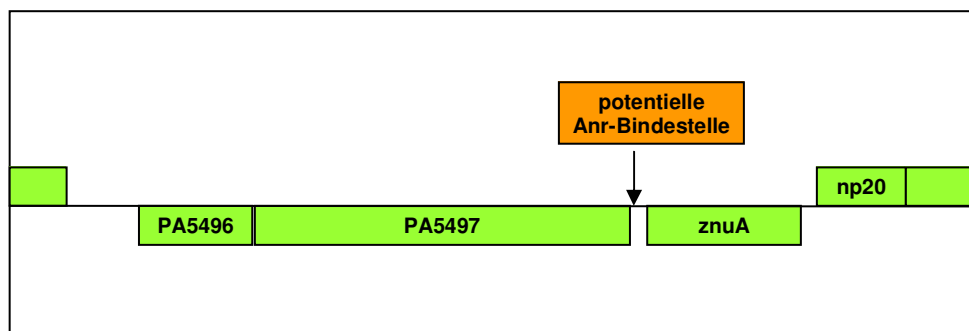
Das als Regulator identifizierte Protein NirQ sorgt für ein Gleichgewicht zwischen der Expression von *nirS* und *norCB*. Dadurch soll eine Anhäufung des toxischen NO während der Denitrifikation vermieden werden (Arai, *et al.*, 1999). Da die Regulation der Expression von *nirS* und *norCB* über die Anr/Dnr-Kaskade erfolgt, erstaunt es nicht, dass auch das Regulatorprotein NirQ unter anaeroben Bedingungen induziert und über diese Kaskade reguliert wird (Arai *et al.*, 1997). Die Proteomanalyse konnte ebenfalls zeigen, dass die Synthese von NirQ (Protein-Nr. 12) in der *dnr*-Mutante 62,5-fach (DE = 0,016) verringert wurde und bestätigt somit, dass die Transkription Dnr-abhängig ist.

Im übereinandergelegten Gel (Abb.44, Bild C) als Protein-Nr. 13 gekennzeichnet, ist HemF nur im Wildtyp-Gel sichtbar. In der *dnr*-Mutante konnte keine Bildung dieses Proteins nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die Transkription von *hemF* ebenfalls durch

Dnr reguliert wird. Rompf *et al.* (1998) konnten anhand von *lacZ*-Promotorfusionen zeigen, daß unter anaeroben Bedingungen sowohl Anr als auch Dnr die Transkription von *hemF* regulieren.

Ein weiteres, in der *dnr*-Mutante reprimiertes Protein ist ModA (Protein-Nr. 15), ein periplasmatisches Molybdat-Bindeprotein und Teil des *modABC*-Operons in *P. aeruginosa*. Dieses Operon codiert die Information für drei Proteine, welche ein Molybdän-Aufnahme-System bilden. Beim Vergleich der Proteinmuster von aeroben und denitrifizierenden Zellen in Minimalmedium wurde deutlich, dass ModA unter denitrifizierenden Bedingungen stark (21,74-fach) induziert vorliegt. In der untersuchten Mutante konnte im Vergleich zum Wildtyp unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium eine 4,4-fache Abnahme (DE = 0,23) der Proteinmenge beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass unter anaeroben Bedingungen für eine optimale Transkription von *modA* Dnr notwendig ist. Da Bioinformatische Untersuchungen im Promotorbereich von *modA* eine potentielle Anr-Bindestelle detektieren konnten, handelt es sich hier vermutlich ebenfalls um eine direkte Regulation durch Dnr.

Das hypothetische Protein PA5496 (Protein-Nr.16) konnte nur im Wildtyp-Gel, nicht in der Mutante detektiert werden. Demnach steht die Expression des dazugehörigen Gens ebenfalls unter dem Einfluß von Dnr. Aufgrund der direkten Nachbarschaft zu PA5497, welches stromaufwärts liegt und die gleiche Leserichtung hat, und dem Ergebnis der vorherigen Proteomanalyse, dass beide Proteine NarL-abhängig sind, werden die Gene beider Proteine möglicherweise in einem Operon transkribiert. Für den Promotorbereich von PA5497 konnte eine potentielle Anr-Bindestelle vorhergesagt werden (Abb.45). Falls beide Gene in einem Operon transkribiert werden, hätte diese Bindestelle auch einen Einfluss auf PA5496. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Abhängigkeit der Expression von Dnr.



**Abb.45: Darstellung der Gene von PA5495 und PA5497 im Genom von *P. aeruginosa*. 15 Basenpaare vor dem ATG von PA5497 befindet sich eine vorhergesagte Anr-Bindestelle.**



Für die weiteren unterschiedlich gebildeten Proteine, NirB, OprE, Ppa und GltB konnten im Promotorbereich der dazugehörigen Gene keine potentiellen Anr-Bindestellen detektiert werden. Demnach handelt es sich nicht wie eben beschrieben um eine direkte, sondern um eine indirekte Regulation durch Dnr.

Die große Untereinheit der assimilatorische Nitritreduktase NirB (Protein-Nr.3) konnte im Vergleich zum Wildtyp im Proteinmuster der *dnr*-Mutante nicht nachgewiesen werden. Die Proteomanalysen zeigen, dass die Transkription der Gene der assimilatorischen Nitritreduktase NirB durch Dnr beeinflusst wird.

Auf das anaerob induzierte Porin der äußeren Membran OprE (Protein-Nr. 6, 7 und 8) scheint Dnr ebenfalls einen induzierenden Einfluss zu haben. Wenn das *dnr*-Gen fehlt und somit kein Regulator gebildet wird, wird die Synthese von OprE bis zu 6,1-fach ( $DE = 0,17$ ) reduziert. Die fehlende potentielle Anr-Bindestelle lässt vermuten, dass Dnr nicht im Promotorbereich von *oprE* bindet sondern indirekt über ein weiteres Regulatorprotein Einfluß auf die Transkription nimmt.

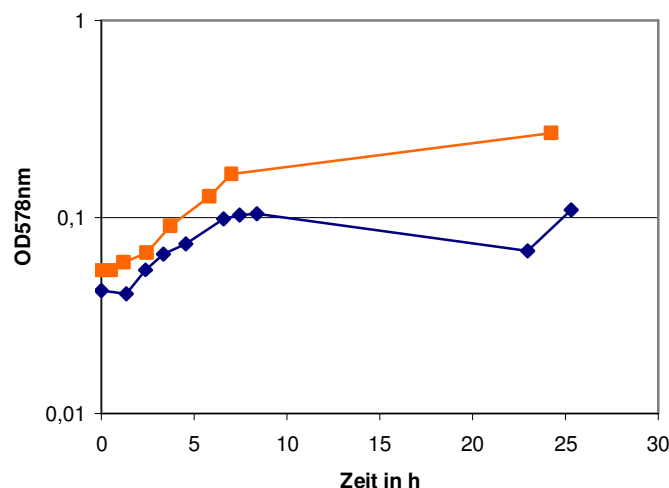
Weiterhin konnten auch einige in der *dnr*-Mutante induzierte Proteine nachgewiesen werden. Die genaue Funktion des Proteins PA3190 (Protein-Nr. 10) ist noch unbekannt. Da das dazugehörige Gen, dessen alter Name *gltB* ist, im genomischen Context an Membran- und ATP-bindende Untereinheiten angrenzt, nimmt man an, dass es sich bei PA3190 um eine Komponente des Bindeproteins eines ABC-Zuckertransporters handelt. Die Synthese dieses Proteins wird in der *dnr*-Mutante 2,8-fach verstärkt. Dies würde bedeuten, dass Dnr im Wildtyp die Expression des dazugehörigen Gens unter denitrifizierenden Bedingungen reprimieren würde. Da im Promotorbereich des Genes keine Anr-Bindestelle detektiert werden konnte, muß es sich hierbei auch um eine indirekte Einflussnahme von Dnr handeln.

Das gleiche gilt auch für das Protein Ppa (Protein-Nr. 14), die anorganische Pyrophosphatase, welche eins in der Natur ubiquitär vorkommendes Enzym ist und eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus und bei biosynthetischen Reaktionen, z.B. Protein-, RNA- und DNA-Synthese, spielt (Lahti *et al.*, 1988). Ppa wird in *dnr*-Mutante 4,1-fach stärker synthetisiert, als im Wildtyp und besitzt im Promotorbereich ebenfalls keine Anr-Bindestelle.

Die Bildung der Argininfermentationsproteine ArcABC ist unabhängig von Dnr. Untersuchungen von Arai *et al.* (1997) zeigten, dass der Regulator Dnr keinen Einfluss auf

die Transkription der Argininfermentations-Gene hat und dass die Aktivität der Arginin-Deiminase (ArcA) in der *dnr*-Mutante equivalent zu der im Wildtyp ist. Durch die Proteomanalyse konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Proteine der Argininfermentation in der *dnr*-Mutante ebenso synthetisiert werden wie im Wildtyp und Dnr die Transkription der dazugehörigen Gene nicht reguliert.

In der *narL*-Mutante konnte, bedingt durch die Repression von NarH, keine Denitrifikation stattfinden. Durch die Verwertung von Arginin kam es dann zu einer 8- bis 10-fachen Erhöhung der Proteinmenge von ArcA und ArcB. Da in der *dnr*-Mutante diese Proteine unverändert bleiben, wird in diesem Fall die Argininfermentation nicht als alternativer Stoffwechselweg zur Denitrifikation genutzt. Dies zeigt sich auch beim Vergleich der Wachstumskurven beider Mutanten (Abb.46). Nach 24 h erreichte die *narL*-Mutante eine OD<sub>578</sub> von 0,268, hingegen die *dnr*-Mutante in gleicher Zeit nur bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,107 wuchs. Möglicherweise ist diese Differenz dadurch bedingt, dass die *narL*-Mutante die Argininfermentation nutzt und die *dnr*-Mutante nicht.



**Abb.46: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* *dnr*-Mutante RM536 (—■—) und *narL*-Mutante PA09194 (—□—) unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit Nitrat als Elektronenakzeptor.**

In den Wachstumskurven (Abb.46) wird deutlich, dass beide Mutanten Nitrat, im Rahmen der Denitrifikation, nicht als Elektronenakzeptor verwerten können.

Da aber in der *narL*-Mutante die Synthese der Argininfermentationsproteine signifikant erhöht ist und ein direkter Einfluss von Dnr auf diese Proteine ausgeschlossen werden kann, verhindert möglicherweise NarL die Induktion von ArcABC.

Dies wird unterstützt durch den Nachweis, dass sowohl Nitrat als auch Nitrit eine Induktion der Enzyme der Argininfermentation unter anaeroben Bedingungen verhindern (Mercenier *et al.*, 1980).

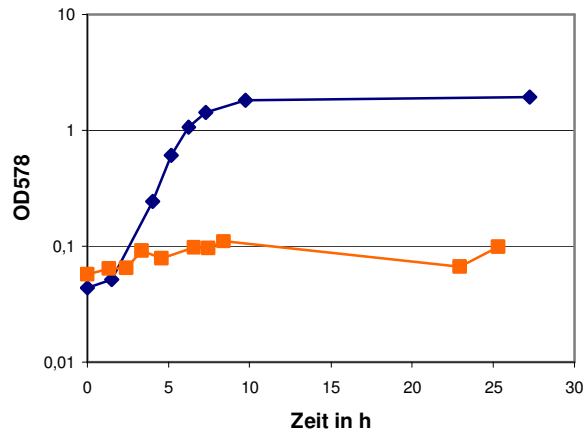
Durch die Proteomanalyse der *dnr*-Mutante RM536 konnte der direkte Einfluß von Dnr auf die Transkription von *narH*, *nirS*, *hemF* und *nirQ* auch auf der Proteinebene bestätigt werden. Desweiteren konnte für zwei weitere Proteine, PA5496 und ModA, ebenfalls eine Dnr-Abhängigkeit festgestellt werden. Untermuert wird dieser Befund durch die Detektion von potentiellen Anr-Bindestellen in den Promotorbereichen der entsprechenden Gene. Aufgrund fehlender potentieller Anr-Bindestellen bei den Proteinen NirB, OprE, Ppa und GltB, wird ein indirekter Einfluss von Dnr auf die Expression der entsprechenden Gene vermutet. Die Bildung der Argininfermentationsproteine ArcABC ist unabhängig von Dnr. Diese Ergebnisse werden im Zusammenhang mit den Proteomanalysen der *anr*- und *anr*-Mutante mit *dnr*-Gen (pHA541) im Kapitel 3.1.8.1 und 3.1.8.2 ausführlich diskutiert.

### **3.1.8 Analyse des Proteoms von PAO6261, einer *anr*-Mutante von *P. aeruginosa*, unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB**

Der Redox-Regulator Anr („anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction“) ist ein Einkomponenten-Regulationssystem, das sowohl Sensor für den Redoxzustand der Zelle, als auch DNA-bindender Transkriptionsfaktor ist. In *P. aeruginosa* konnten bisher nur wenige Anr-abhängige Gene experimentell identifiziert werden. Dazu gehören die Gene des Arginin Deiminase-Operons *arcDABC* (Galimand *et al.*, 1991), die Denitrifikationsgene *narGHI* (Krieger, 2001), die Gene der Cyanogenese *hcnABC* (Zimmermann *et al.*, 1991), einige Gene der Hämbiosynthese (*hemA*, Krieger *et al.*, 2002; *hemN* und *hemF*, Rompf *et al.*, 1998), die Gene der Cyanid-insensitiven terminalen Oxidase CIO (Cooper *et al.*, 2003), das Gen, welches die Information für Azurin trägt (Vijgenboom *et al.*, 1997) und das *dnr*-Gen (Arai *et al.*, 1997). Weiterhin kontrolliert Anr ein Operon, dessen Gene für eine Phosphotransacetylase (*pta*) und eine Acetatkinase (*ackA*) kodieren. Beide Gene sind essentiell für ein langes Überleben von *P. aeruginosa* während der Pyruvat-Fermentation (Eschbach *et al.*, 2004 a).

Durch den Vergleich der Proteinmuster von PA01 Wildtyp-Zellen und *anr*-Mutanten-Zellen sollen weitere Proteine identifiziert werden, deren Synthese, bzw. die Transkription der dazugehörigen Gene, durch Anr beeinflusst werden.

Auch hier zeigt die Mutante in der Wachstumskurve unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor einen deutlichen Phänotyp (Abb.48). Ebenso wie die *dnr*-Mutante wächst die *anr*-Mutante innerhalb von 24 h nur auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1. Der Wildtyp erreicht eine OD<sub>578</sub> von 1,96.



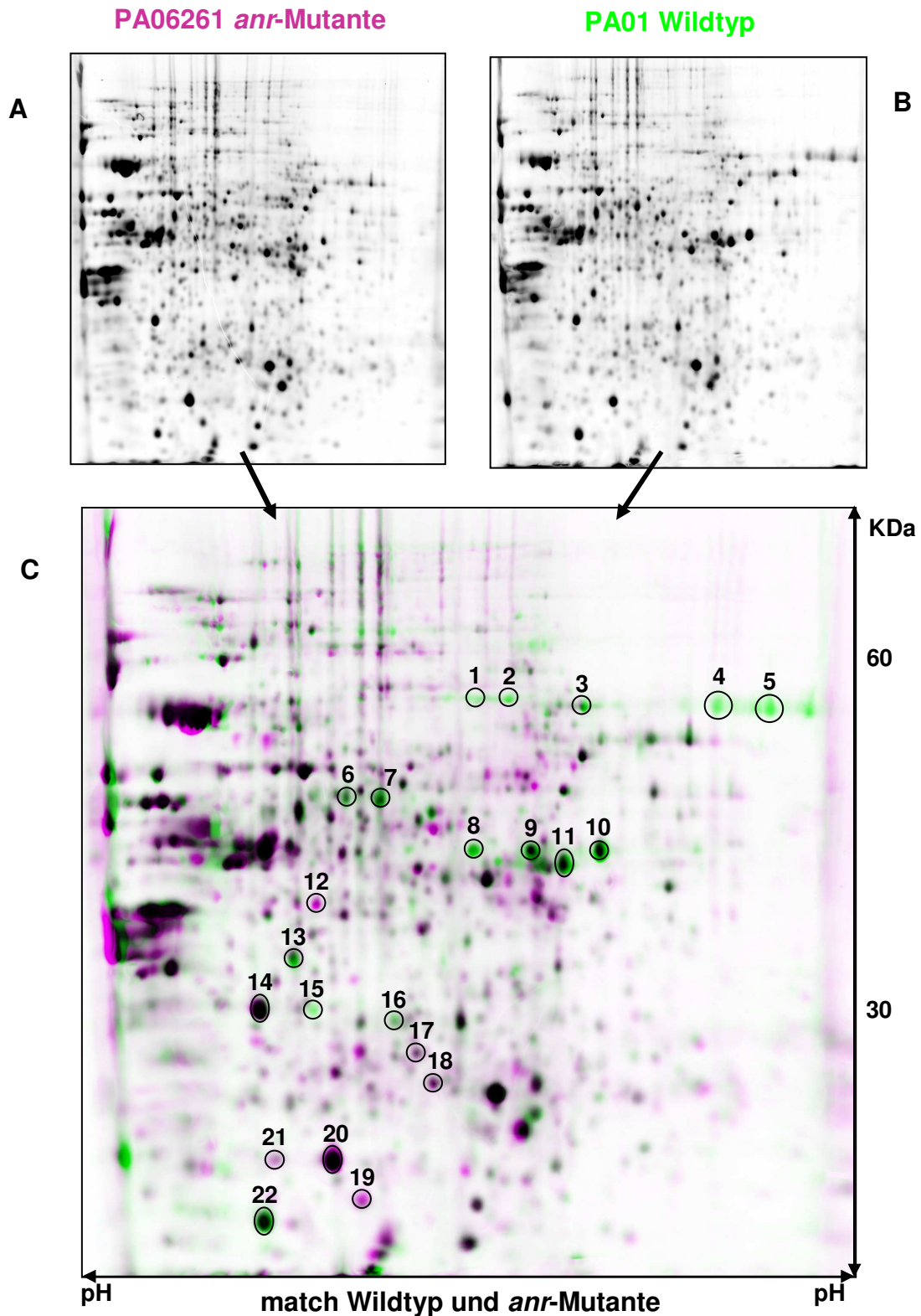
**Abb.48: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* Wildtyp (PA01) (—■—) und der *anr*-Mutante PA06261 (—□—) unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit Nitrat als Elektronenakzeptor.**

Die Zellen wurden unter folgenden Bedingungen (Tab.27) inkubiert, geerntet und Proteine für 2D-Gel-Analysen präpariert. Die Zellernte der *anr*-Mutante erfolgte nach 7,3 h bei einer durchschnittlichen OD<sub>578</sub> von 0,09. Von jedem Ansatz wurden drei parallele Kulturen aufgearbeitet und ausgewertet. Aufgrund von Schwankungen im Proteinmuster und Qualitätsunterschieden wurden für die weitere Auswertung jeweils zwei Gele zu einem Mastergel zusammengefasst.

**Tab.27: Wachstumsbedingungen der *P. aeruginosa* Wildtypkultur und *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen**

| Bedingung                     | Wildtyp PA01 /<br><i>anr</i> -Mutante<br>(PA06261) |
|-------------------------------|--|
| Medium                        | LB   |
| e-Akzeptor                    | Nitrat<br>(50 mM KNO <sub>3</sub> )                |
| OD <sub>578nm</sub> Zellernte | 0,5 / 0,09   |
| Aufgetragene<br>Proteinmenge  | 700 µg   |
| pH-Gradienten                 | 5 - 8  |
| Polyacrylamidkonz.            | 10%  |

Während der digitalen Auswertung wurde das Mastergel der Wildtypzellen grün eingefärbt und das Mastergel der Mutantenzellen wurde rot dargestellt. In folgender Abbildung sind die Bilder der einzelnen Mastergele, sowie das durch Übereinanderlegen entstandene Bild zu sehen (Abb.49).



**Abb.49: Vergleich der Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtypzellen und Zellen der *anr*-Mutante (PA06261) unter denitrifizierenden Bedingungen in LB-Medium.**

Es wurden jeweils 700 µg Protein in einem pH-Bereich von 5- 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 10%-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung visualisiert. A: Proteinmuster von *anr*-Mutanten-Zellen, B: Proteinmuster von Wildtypzellen, C: Überlagerung beider Gele, wobei Bild A in rot und Bild B in grün dargestellt sind. Identische Proteinmengen führen bei der Überlagerung zu schwarzen Proteinflecken.

Tab.28: **Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps und der *anr*-Mutante in LB-Medium unter denitrifizierenden Bedingungen induziert wurden.** Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb.49), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein  | pI theor. | Mw theor. | RE Wildtyp | RE <i>anr</i> -Mutante | DE          |
|----|------|--|-----------|-----------|------------|------------------------|-------------|
| 1  | 3874 | NarH respiratorische Nitratreduktase (beta chain)                  | 5,71      | 58,08     | 2630       |                        | -           |
| 2  |      | NarH   |           |           | 2132       | 23                     | <b>0,01</b> |
| 3  | 4236 | KatA Katalase  | 6,21      | 55,56     | 3429       | 903                    | <b>0,25</b> |
| 4  | 1781 | NirB Assimilatorische Nitritreduktase (große UE)                   | 6,32      | 89,67     | 3619       |                        | -           |
| 5  | 0519 | NirS Nitritreduktase (precursor)                                   | 8,26      | 62,63     | 4892       |                        | -           |
| 6  | 5171 | ArcA Arginin-Deiminase   | 5,37      | 46,41     | 4261       | 1802                   | <b>0,4</b>  |
| 7  |      | ArcA   |           |           | 9099       | 1421                   | <b>0,15</b> |
| 8  | 0291 | OprE anaerob induziertes Porin der äußeren Membran                 | 8,93      | 49,64     | 2208       |                        | -           |
| 9  |      | OprE   |           |           | 12189      | 3752                   | <b>0,29</b> |
| 10 |      | OprE   |           |           | 17970      | 6654                   | <b>0,35</b> |
| 11 | 5172 | ArcB Katabolische Ornithin-Carbomyltransferase                     | 6,12      | 38,09     | 9632       | 9021                   | <b>0,88</b> |
| 12 | 3190 | GltB probl. Komponente des Bindeprotein des ABC Zuckertransporters | 5,55      | 45,11     | 468        | 3838                   | <b>7,69</b> |
| 13 | 5173 | ArcC Carbamatkinase  | 5,02      | 33,06     | 6801       | 2586                   | <b>0,36</b> |
| 14 | 3655 | Tsf Elongationsfaktor Ts   | 5,01      | 30,63     | 13563      | 14672                  | <b>1,02</b> |
| 15 | 0520 | NirQ regulatorisches Protein NirQ                                  | 5,13      | 28,88     | 1322       |                        | -           |
| 16 | 0024 | HemF Coproporphorynogen III Oxidase, aerob                         | 5,49      | 34,75     | 2138       | 322                    | <b>0,14</b> |
| 17 | 3244 | MinD Zellteilungsinhibitor   | 5,4       | 29,6      | 1183       | 1920                   | <b>1,52</b> |
| 18 | 3397 | Fpr Ferredoxin-NADP+ -Reduktase                                    | 5,57      | 29,5      | 1543       | 2139                   | <b>1,30</b> |
| 24 | 3326 | probl. Clp-Familie ATP-abhängige Protease                          | 5,27      | 22,12     | 792        | 3356                   | <b>3,98</b> |
| 20 | 3529 | TsaA probl. Peroxidase   | 5,22      | 21,8      | 15147      | 17849                  | <b>1,11</b> |
| 21 |      | TsaA   |           |           | 800        | 1605                   | <b>1,88</b> |
| 22 | 4366 | SodB Superoxid Dismutase   | 5,12      | 21,33     | 14239      | 11495                  | <b>0,76</b> |
| 23 | 1677 | hypothetisches Protein   | 6,05      | 21,01     | 5345       | 13576                  | <b>2,38</b> |

Die Proteomanalysen zeigen, dass die Transkription von 12 der identifizierten Proteine durch Anr beeinflusst wird. Drei der Proteine (GltB, PA1677 und PA3326) wurden in der *anr*-Mutante stärker gebildet als im Wildtyp und neun Proteine (NarH, KatA, NirB, NirS, ArcA, ArcC, OprE, NirQ und HemF) erfuhren eine Reduzierung ihrer Synthese.

Für sieben der 12 Proteine konnten im Promotorbereich des entsprechenden Genes mittels bioinformatischer Analysen Anr-Bindestellen detektiert werden (Tab.29). Vier dieser Bindestellen wurden bereits in der Literatur beschrieben und zwei weitere, die für *katA* und *narH*, wurden im Rahmen dieser Arbeit und in Zusammenarbeit mit Katharina Trunk bestätigt und in einer Veröffentlichung eingereicht. Da die Gene der Argininfermentation (*arcABC*) in einem Operon transkribiert werden, handelt es sich bei den beiden Proteinen ArcA und ArcC um ein und dieselbe Anr-Bindestelle. In folgenden Tabellen sind die Daten zusammengefasst:

**Tab.29: Durch Proteomanalysen identifizierte Proteine, deren Transkription durch Anr beeinflusst wird.** Für die Gene der Proteine in Tabelle a) konnten im Promotorbereich potentielle Anr-Bindestellen detektiert werden, für die Gene der Proteine in Tabelle b) nicht.

**a) mit Anr-Bindestelle**

| PA   | Protein |  | Referenz                          | Bindestelle    |
|------|---------|--|-----------------------------------|----------------|
| 0024 | HemF    | Coproporphorynogen III Oxidase, aerob        | (Rompf <i>et al.</i> , 1998)      | TTGACGGCCGTCAA |
| 0519 | NirS    | Nitritreduktase (precursor)                  | (Arai <i>et al.</i> , 1991)       | TTGATTCCGGTCAA |
| 0520 | NirQ    | regulatorisches Protein NirQ                 | (Arai <i>et al.</i> , 1994)       | TTGATTCCGGTCAA |
| 3874 | NarH    | respiratorische Nitratreduktase (beta chain) | (Trunk <i>et al.</i> , submitted) | TTGATTCCTATCAA |
| 4236 | KatA    | Katalase                                     | (Trunk <i>et al.</i> , submitted) | TTGTCTCCGCCAA  |
| 5171 | ArcA    | Arginin-Deiminase                            | (Gallimand <i>et al.</i> , 1991)  | TTGATCGGCATCAA |
| 5173 | ArcC    | Carbamatkinase                               | (Gallimand <i>et al.</i> , 1991)  |                |

**b) ohne Anr-Bindestelle**

| PA   | Protein |  |
|------|---------|--|
| 0291 | OprE    | anaerob induziertes Porin der äußeren Membran                |
| 1677 |         | hypothetisches Protein                                       |
| 1781 | NirB    | Assimilatorische Nitritreduktase (große UE)                  |
| 3190 | GltB    | mögl. Komponente des Bindeprotein des ABC Zuckertransporters |
| 3326 |         | mögl. Clp-Familie ATP-abhängige Protease                     |

Ebenso wie in der *dnr*-Mutante sind die Proteine, welche an der Denitrifikation beteiligt sind, auch in der *anr*-Mutante deutlich weniger oder nicht vorhanden. Dazu gehören NarH (Protein-Nr. 1 und 2), eine Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase, NirS (Protein-Nr. 5), die dissimilatorische Nitritreduktase und das Regulatorprotein NirQ (Protein-Nr. 15). Arai *et al.* (1997) zeigte, daß die Gene der Nitritreduktase und der NO-Reduktase, ebenso wie das Gen des Regulators NirQ über die Anr-Dnr-Kaskade reguliert werden. Dabei induziert Anr die Transkription von *dnr*, dessen Produkt wiederum die Expression der eben genannten Gene bewirkt. Weiterhin konnte über eine *lacZ*-Promotorfusion gezeigt werden, dass in der *anr*-Mutante PA06261 keine transkriptionelle Aktivität des *dnr*-Gens vorhanden ist (Arai *et al.*, 1997), was bedeutet, dass in der *anr*-Mutante kein Dnr gebildet werden kann. Somit handelt es sich bei der *anr*-Mutante eigentlich um eine *anr-dnr*-Doppelmutante.

Durch das zusätzliche Fehlen, bzw. durch die Verminderung von NirS und NirQ im Proteinmuster der *dnr*-Mutante wird bestätigt, dass Anr auf die Transkription der dazugehörigen Gene nur einen indirekten Einfluss ausübt, d.h. beide Proteine über die Anr-Dnr-Kaskade reguliert werden.

Durch die Proteomanalysen der Mutanten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Untereinheit der Nitratreduktase NarH sowohl in der *dnr*-Mutante als auch in der *anr*-Mutante sehr stark reduziert bzw. gar nicht mehr gebildet wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression der Nitratreduktase-Gene ebenfalls über diese

Kaskade reguliert werden und Anr nur einen indirekten Einfluss ausübt. Die Regulation durch Dnr erfolgt wahrscheinlich dann durch die im Promotorbereich des *narK<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHJI*-Operon detektierte potentielle Anr-Bindestelle.

Über die Regulation von *hemF* ist bekannt, dass beide Regulatoren, Dnr und Anr, einen direkten Einfluss auf die Transkription haben (Rompf *et al.*, 1998). Die Proteomanalysen zeigten, dass in der *anr*-Mutante die Bildung von HemF (Protein-Nr. 16) im Vergleich zum Wildtyp, 7,1-fach (DE = 0,14) verringert wurde. In der *dnr*-Mutante konnte allerdings kein HemF nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Expression von *hemF* unter anaeroben Bedingungen von beiden Regulatoren induziert werden kann.

Für die Katalase KatA (Protein-Nr. 3) konnte mittels bioinformatischer Analysen im Promotorbereich des entsprechenden Genes ebenfalls eine potentielle Anr-Bindestelle detektiert werden. Das Anr, wahrscheinlich über diese Bindestelle, die Transkription von *katA* beeinflusst, wird auch im Proteinmuster deutlich. In der *anr*-Mutante war, im Vergleich zum Wildtyp, nur ein Viertel der Proteinmenge nachweisbar.

Die Gene der Argininfermentation *arcDABC* werden nicht über die Anr-Dnr-Kaskade reguliert, sondern stehen unter dem direkten Einfluss von Anr (Galimand *et al.*, 1991; Arai *et al.*, 1997). Im Vergleich der Proteinmuster von Wildtypzellen und Mutantenzellen wird deutlich, dass die Proteine ArcAC im Wildtyp 2,52 - 6,8-fach stärker synthetisiert werden, als in der *anr*-Mutante. ArcB zeigte eine schwache, aber keine signifikante Induktion (Tab.28). Da in der *dnr*-Mutante die drei Proteine der Argininfermentation im gleichen Maße synthetisiert wurden wie im Wildtyp, wird durch die Proteomanalysen bestätigt, dass die Regulation von *arcABC* nicht über die Anr-Dnr-Kaskade erfolgt, sondern durch Anr direkt.

Die DE-Werte des anaerob induzierten Porin der äußeren Membran, OprE (Protein-Nr. 8, 9 und 10) zeigen, dass ebenso wie in der *dnr*-Mutante, die Expression von *oprE* auch in der *anr*-Mutante reprimiert wird. Das Protein Nr.8 konnte nur im Wildtyp nachgewiesen werden, Protein Nr.9 wurde in der *anr*-Mutante 3,45-fach reduziert und Protein Nr.10 2,86-fach. Hierbei handelt es sich um die gleiche Größenordnung wie in der *dnr*-Mutante. Unklar bleibt, ob die Induktion über die Anr-Dnr-Kaskade erfolgte oder Anr auch allein einen Einfluß auf die Transkription von *oprE* hat. Eine direkte Regulation von *oprE* über die beiden Regulatoren steht im Widerspruch zur bioinformatischen Analyse, welche im Promotorbereich des Genes keine potentielle Anr-Bindestelle detektieren konnte. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen sekundären Effekt, d.h., dass Anr und



Dnr ein weiteres regulatorisches Protein beeinflussen, welches dann die Transkription von *oprE* direkt induziert, bzw. reprimiert.

Die große Untereinheit der assimilatorischen Nitritreduktase NirB (Protein-Nr.4) ist ebenfalls in der *anr*-Mutante nicht nachweisbar. Da das Protein auch schon in der *dnr*-Mutante fehlte, liegt die Vermutung nahe, dass es über die Anr-Dnr-Kaskade reguliert wird. Jedoch konnte auch im Promotorbereich von *nirB* keine potentielle Anr-Bindestelle nachgewiesen werden. Demnach muss es sich bei der Regulation durch Anr und Dnr ebenfalls um einen sekundären Effekt handeln.

Neben einer Anzahl an reduzierten Proteinen in der *anr*-Mutante, konnten auch drei induzierte Proteine detektiert werden. Da die Promotorbereiche der drei entsprechenden Gene keine potentielle Anr-Bindestelle enthalten, handelt es sich wahrscheinlich um eine indirekte Einflussnahme von Anr auf die Transkription. Das bedeutet, dass Anr die Expression eines weiteren Regulators induziert, welcher dann wiederum die Expression von Genen während des anaeroben Wachstums reprimiert.

Zu den induzierten Proteinen gehört PA3190 (Protein-Nr.12), dessen genaue Funktion noch unbekannt ist. Bei diesem Protein, dessen alter Name GltB ist, handelt es sich wahrscheinlich um eine Komponente des Bindeproteins eines ABC-Zuckertransporters. Die Synthese dieses Proteins wurde sowohl in der *dnr*-Mutante (2,8-fach), als auch in der *anr*-Mutante (7,69-fach) verstärkt.

Das hypothetische Protein PA1677, dessen Funktion auch noch unbekannt ist, wird ebenfalls in der *anr*-Mutante 2,38-fach induziert.

Ein weiteres, bisher noch unbekanntes Protein, welches in der *anr*-Mutante 3,98-fach induziert vorliegt, ist PA3326. Aufgrund seiner 64%-igen Ähnlichkeit zur ATP-abhängigen Protease ClpP in *E. coli* handelt es sich hierbei wahrscheinlich um eine ATP-abhängige Protease der Clp-Familie ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

Es konnten fünf weitere, in vorhergehenden Kapiteln schon beschriebene, Proteine in den 2D-Gelen detektiert werden, welche nicht durch Anr beeinflusst werden. Dabei handelt es sich um

- MinD, einem Zellteilungsinhibitor (Protein-Nr. 17),
- Fpr, eine Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (Protein-Nr. 18),
- TsaA, einer möglichen Peroxidase (Protein-Nr. 20 und 21) und
- SodB, der Superoxid-Dismutase (Protein-Nr. 22).

Für keines dieser Proteine wurde eine potentielle Anr-Bindestelle vorhergesagt.

Aufbauend auf die Ergebnisse der Proteomanalyse der *dnr*-Mutante konnte durch die Untersuchung des Proteinmusters der *anr*-Mutante, die Regulation der Gene *narH*, *nirS* und *nirQ* über die Anr-Dnr-Kaskade bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Gene der Argininfermentation und *hemF* nicht über die Kaskade, sondern direkt durch Anr reguliert werden. Ferner beeinflusst Anr die Transkription von *katA*.

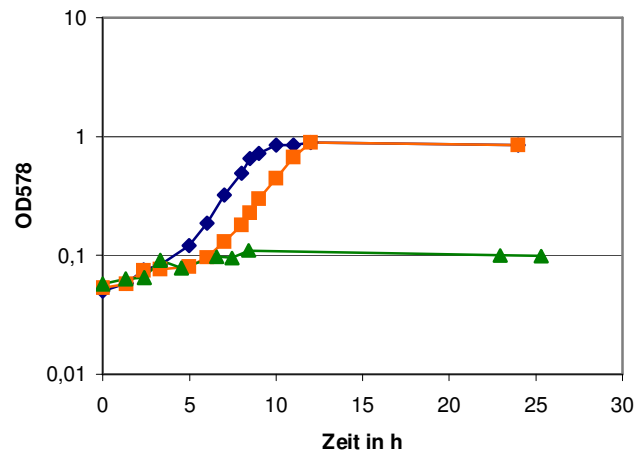
Die Proteine NirB und OprE wurden in der *anr*-Mutante weniger gebildet. Ebenso wie die in der *anr*-Mutante stärker synthetisierten Proteine PA1677, PA3326 und GltB besitzen NirB und OprE keine potentielle Anr-Bindestelle im Promotorbereich der entsprechenden Gene, so dass in diesen Fällen von einer indirekten Regulation durch Anr ausgegangen werden muss.

In nun folgendem Kapitel werden, im Zusammenhang mit der Analyse der *anr*-Mutante, welche mit dem *dnr*-Gen (pHA541) komplementiert wurde, die Proteomdaten aller untersuchten Mutanten zusammengefasst und diskutiert.

### **3.1.9 Analyse des Proteoms der PAO6261 *anr*-Mutante, welche mit dem *dnr*-Gen (pHA541) komplementiert wurde, unter denitrifizierenden Bedingungen im Vollnährmedium LB**

Während der Analysen der Proteinmuster der *dnr*- und *anr*-Mutante wurde deutlich, dass die in der *anr*-Mutante unterschiedliche Induktion der Proteine nicht ausschließlich durch Anr bedingt sein muß, sondern auch über die Anr-Dnr-Kaskade oder indirekt erfolgen kann. Über eine *lacZ*-Promotorfusion konnte gezeigt werden, dass in der *anr*-Mutante PA06261 keine transkriptionelle Aktivität des *dnr*-Gens vorhanden ist (Arai *et al.*, 1997). Das bedeutet, dass in der *anr*-Mutante, auch kein Dnr gebildet werden kann, und somit handelt es sich bei der *anr*-Mutante eigentlich um eine *anr-dnr*-Doppelmutante. Um zu gewährleisten, dass in der *anr*-Mutante Dnr vorhanden ist und somit der direkte Einfluss von Anr untersucht werden kann, wurde die Mutante mit einem Plasmid (pHA541) komplementiert, welches das *dnr*-Gen mit einem Anr-unabhängigen Promotor (*tac*-Promotor) enthält. Beim Vergleich der Proteinmuster des Wildtyps und der komplementierten Mutante (*anr*-Mutante PA06261/*dnr*-Gen) sollten nur die Proteine unterschiedlich induziert sein, deren Gene einzig durch Anr reguliert werden.

Um die für das Plasmid bereits beschriebene Komplementation zu reproduzieren, wurden wie in der Veröffentlichung angegeben, für die Wachstumstests 20 mM NaNO<sub>3</sub> verwendet (Arai *et al.*, 1997).



**Abb.51: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* Wildtyp PA01 (—◆—), der *anr*-Mutante PA06261 (—▲—) und der mit *dnr* (pHA541) komplementierten *anr*-Mutante (—■—) unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit 20mM NaNO<sub>3</sub> als Elektronenakzeptor. Die Kultur mit der kompl. Mutante enthielt zusätzlich 500µg/ml Carbenicillin.**

Anhand der Wachstumskurven von Wildtyp, *anr*-Mutante und komplementierter *anr*-Mutante wird deutlich, wie wichtig Dnr für anaerobes Wachstum mit Nitrat ist (Abb.51).

Wird die *anr*-Mutante mit dem *dnr*-Gen komplementiert, erreicht sie innerhalb von 10 Stunden die gleiche OD<sub>578</sub> wie der Wildtyp. Dabei unterscheidet sich die Verdopplungszeit der komplementierten Mutante (1h und 44 min) nur geringfügig von der des Wildtyps (1h und 31 min). Die verlängerte lag-Phase der komplementierten Mutante kann zu einem durch das Vorhandensein des Plasmids und der damit verbundenen Antibiotikazugabe ins Medium bedingt sein, oder durch das Fehlen von Anr und das damit verbundene Fehlen der durch Anr induzierten Gene.

Erstaunlicherweise kann eine *anr*-Mutante durch Dnr komplementiert werden und mit Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor wachsen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Dnr abhängige Gene (*nirS*, *norCB*, *nosZ*) unter diesen Bedingungen essentiell sind und nicht direkt Anr abhängig.

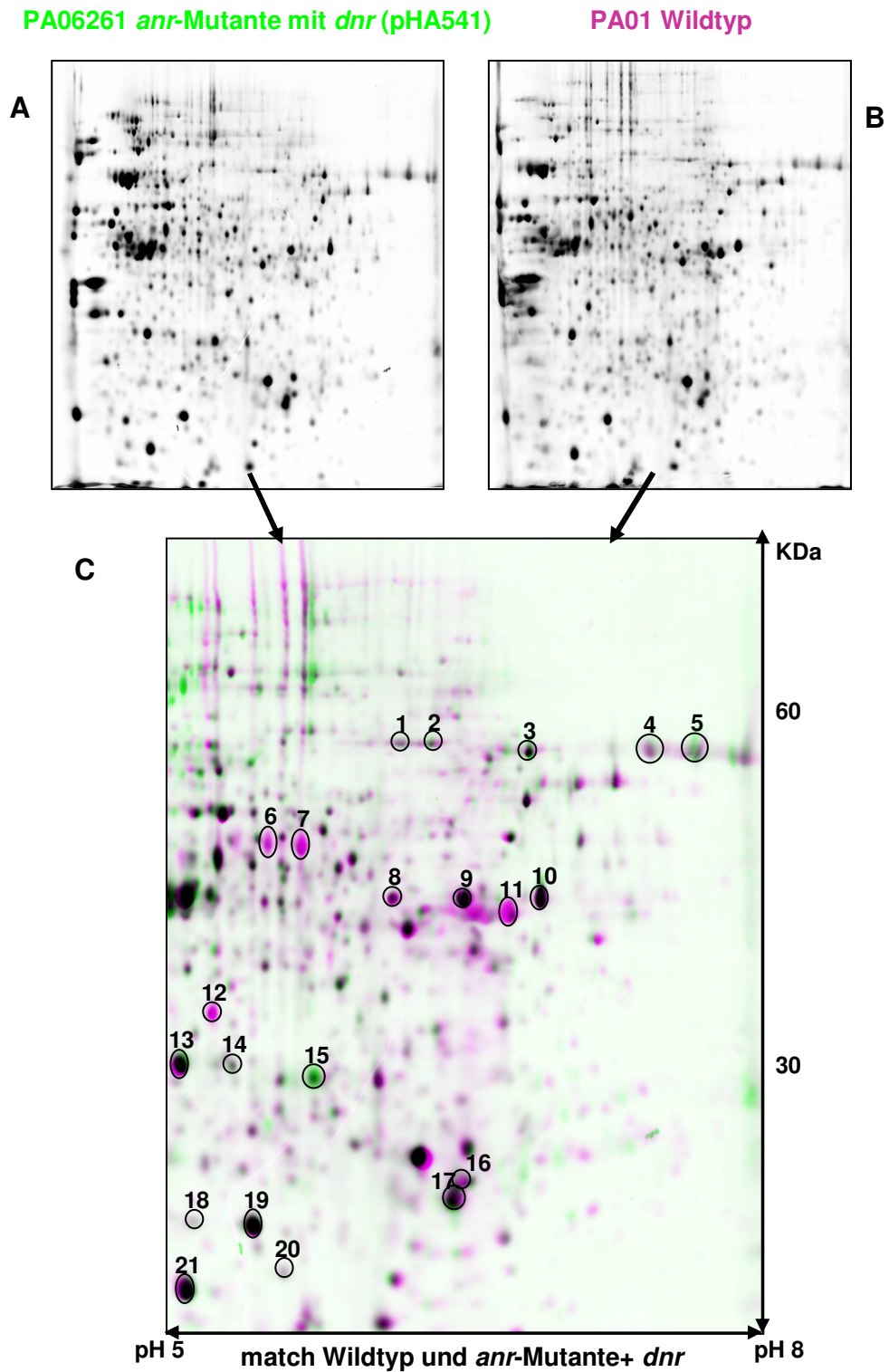
Für die Proteomanalysen wurden drei parallele Wildtyp-Kulturen und drei Kulturen der komplementierten Mutante unter denitrifizierenden Bedingungen gezüchtet, bei einer OD<sub>578</sub> von 0,5 geerntet und die Proteine präpariert. In folgender Tabelle sind alle Parameter zusammengefasst:

**Tab.30: Wachstumsbedingungen des PA01 Wildtyps und der mit *dnr* komplementierten *anr*-Mutante unter denitrifizierenden Bedingungen und Parameter der 2D-Gel-Präparation**

| <b>Bedingung</b>              | <b>Wildtyp PA01 /<br/><i>anr</i>-Mutante (PA06261)<br/>mit <i>dnr</i> (pHA541)</b> |
|-------------------------------|--|
| Medium                        | LB   |
| e-Akzeptor                    | Nitrat<br>(50 mM KNO <sub>3</sub> )  |
| OD <sub>578nm</sub> Zellernte | 0,5  |
| Aufgetragene<br>Proteinmenge  | 700 µg   |
| pH-Gradienten                 | 5 - 8  |
| Polyacrylamidkonz.            | 10%  |

Aufgrund von Qualitätsunterschieden (Auftrennung) der Gele wurden von den drei Parallelen für die weitere Auswertung jeweils nur zwei Gele zu einem Mastergel zusammengefasst.

Während der digitalen Auswertung wurde das Mastergel der Wildtypzellen grün eingefärbt und das Mastergel der Mutantenzellen wurde rot dargestellt. In folgender Abbildung (Abb.52) sind die Bilder der einzelnen Mastergele, sowie ein Ausschnitt des durch Übereinanderlegen entstandenen Bildes zu sehen.



**Abb.52: Vergleich der Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtypzellen und Zellen der *anr*-Mutante (PA06261) komplementiert mit pHA541 (*dnr*-Gen) unter denitrifizierenden Bedingungen in LB-Medium.**

Es wurden jeweils 700 µg Protein in einem pH-Bereich von 5 - 8 isoelektrisch fokussiert, in der zweiten Dimension in einer 10%-igen SDS-PAGE getrennt und mit RuBPS-Fluoreszenzfärbung visualisiert. A: Proteinmuster von *anr*-Mutanten-Zellen mit *dnr* (pHA541), B: Proteinmuster von Wildtypzellen, C: Überlagerung beider Gele, wobei Bild A in grün und Bild B in rot dargestellt sind (Ausschnitt). Identische Proteinmengen führen bei der Überlagerung zu schwarzen Proteinflecken.

**Tab.31: Unter denitrifizierenden Bedingungen induzierte Proteine in *P. aeruginosa* Wildtypzellen und in der *anr*-Mutante (PA06261) komplementiert mit *dnr* (pHA541).** Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden zu jedem Protein die Nummer im dazugehörigen Gel (Abb.52), die PA-Nummer, die Bezeichnung und die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine angegeben. Die RE-Werte geben relative Proteinmengen an und die DE-Werte den Induktionsfaktor.

|    | PA   | Protein  | pI<br>theor. | Mw<br>theor. | RE <i>anr</i> -<br>Mutante<br>+ <i>dnr</i> | RE<br>Wildtyp | DE           |
|----|------|--|--------------|--------------|--|---------------|--------------|
| 1  | 3874 | NarH Respiratorische Nitratreduktase (beta chain)  | 5,71         | 58,08        | 2301                                       | 1576          | <b>0,91</b>  |
| 2  |      | NarH   |              |              | 2250                                       | 1258          | <b>0,74</b>  |
| 3  | 4236 | KatA Katalase                                      | 6,21         | 55,56        | 5501                                       | 1931          | <b>0,46</b>  |
| 4  | 1781 | NirB Assimilatorische Nitritreduktase (große UE)   | 6,32         | 89,67        | 2492                                       | 2304          | <b>1,22</b>  |
| 5  | 0519 | NirS Nitritreduktase (precursor)                   | 8,26         | 62,63        | 5744                                       | 3170          | <b>0,73</b>  |
| 6  | 5171 | ArcA Arginin-Deiminase                             | 5,37         | 46,41        | 572  | 4198          | <b>9,69</b>  |
| 7  |      | ArcA   |              |              | 3258                                       | 6659          | <b>2,7</b>   |
| 8  | 0291 | OprE anaerob induziertes Porin der äußeren Membran | 8,93         | 49,64        | 4217                                       | 3950          | <b>1,24</b>  |
| 9  |      | OprE   |              |              | 16035                                      | 4575          | <b>0,38</b>  |
| 10 |      | OprE   |              |              | 23658                                      | 8412          | <b>0,47</b>  |
| 11 | 5172 | ArcB katabolische Ornithin-Carbomyltransferase     | 6,12         | 38,09        | 1179                                       | 15266         | <b>12,95</b> |
| 12 | 5173 | ArcC Carbamatkinase                                | 5,02         | 33,06        | 1186                                       | 4701          | <b>5,24</b>  |
| 13 | 3655 | Tsf Elongationsfaktor Ts                           | 5,01         | 30,63        | 16954                                      | 10035         | <b>0,78</b>  |
| 14 | 0520 | NirQ Regulatorisches Protein NirQ                  | 5,13         | 28,88        | 2215                                       | 830           | <b>0,5</b>   |
| 15 | 0024 | HemF Coproporphorynogen III Oxidase, aerob         | 5,49         | 34,75        | 6916                                       | 1030          | <b>0,2</b>   |
| 16 | 5496 | Hypothetisches Protein                             | 5,96         | 24,86        | 408  | 3471          | <b>6,45</b>  |
| 17 | 1677 | Hypothetisches Protein                             | 6,05         | 21,01        | 8947                                       | 5186          | <b>0,77</b>  |
| 18 | 3529 | TsaA probl. Peroxidase                             | 5,22         | 21,8         | 1509                                       | 694           | <b>0,61</b>  |
| 19 |      | TsaA   |              |              | 19137                                      | 10721         | <b>0,74</b>  |
| 20 | 3326 | probl. Clp-Familie ATP-abhängige Protease          | 5,27         | 22,12        | 1092                                       | 655           | <b>0,79</b>  |
| 21 | 4366 | SodB Superoxid Dismutase                           | 5,12         | 21,33        | 18602                                      | 10610         | <b>0,75</b>  |

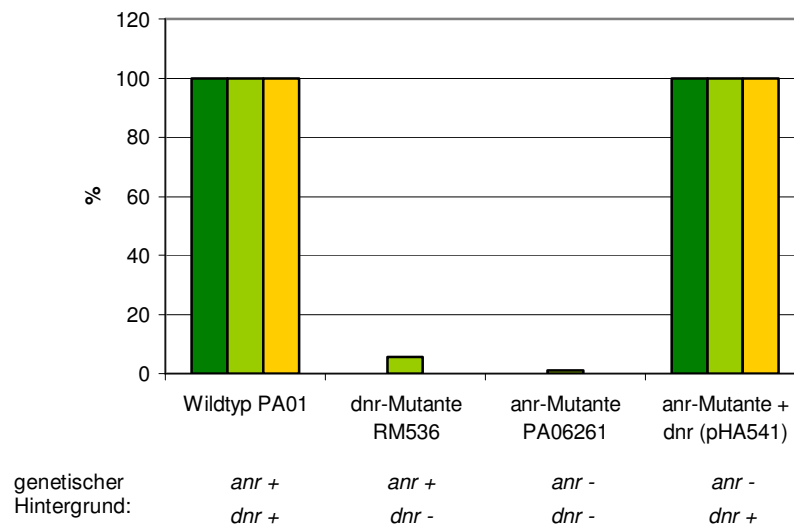
Der Elongationsfaktor Ts (Protein-Nr. 13), die mögliche Peroxidase TsaA (Protein-Nr. 18 und 19), sowie die Superoxid-Dismutase SodB (Protein-Nr. 21) zeigen beim Vergleich der Proteinmuster von Wildtyp mit *anr*-Mutante mit *dnr* (pHA541), sowie mit der *anr*-Mutante, keinen Unterschied in ihrer Konzentration. Die DE-Werte dieser Proteine liegen in einem Bereich von 0,5 bis 2 (Tab. 28 und 31). Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression der entsprechenden Gene weder von Anr noch von Dnr reguliert wird. Dieses Ergebnis stimmt mit den bioinformatischen Analysen überein, welche für die Promotorbereiche der entsprechenden Gene auch keine potentielle Anr-Bindestelle nachweisen konnten.

Um die Regulation der einzelnen Proteine in Abhängigkeit von Anr und Dnr aufzuzeigen, werden alle weiteren in Tabelle 31 aufgeführten Proteine im Folgenden im Zusammenhang mit den Daten der *anr*-Mutante (PA06261) und der *dnr*-Mutante (RM536) und gegebenenfalls mit den Daten der *narL*-Mutante (PA09104) diskutiert. Auch hier

erfolgt eine Unterteilung in Proteine, deren Gene im Promorbereich eine potentielle Anr-Bindestelle besitzen und Proteine ohne Anr-Bindestelle im Promotorbereich ihrer Gene.

### 3.1.9.1 Proteine mit potentieller Anr-Bindestelle im Promotorbereich der entsprechenden Gene

Die Proteine NarH (Protein-Nr. 1 und 2), eine Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase und NirS (Protein-Nr. 5), die dissimilatorische Nitritreduktase zeigen bei dem Vergleich der Proteinmuster von Wildtyp und *anr*-Mutante mit *dnr* keinen signifikanten Unterschied. Die DE-Werte liegen zwischen 0,5 und 2 (Tab. 31). In folgendem Diagramm sind die Daten von NirS und den beiden, im Gel (Abb. 52) nebeneinander liegenden NarH-Proteinen aus der *dnr*-Mutante, *anr*-Mutante und der mit *dnr* komplementierten *anr*-Mutante zusammengefasst. Die Menge an Protein im Wildtyp entspricht 100%.



**Abb. 53: Zusammenfassende Auswertung der Bildung von NirS und NarH in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PA01 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an NarH und NirS. Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat. Das an zwei verschiedenen Stellen im Gel identifizierte NarH wurde mit zwei grünen Balken (■ und ■) dargestellt und NirS mit einem gelben Balken (■).

Unter denitrifizierenden Bedingungen können die Proteine NarH und NirS im Proteinmuster des Wildtyps nachgewiesen werden. Wird in der Zelle kein Dnr produziert, wie es in der *dnr*- und *anr*-Mutante der Fall ist, fehlen beide Proteine im Proteinmuster, bzw. sind nur schwach nachweisbar. Erst wenn Dnr wieder in der Zelle gebildet wird (*anr*-

Mutante mit *dnr*), werden die Gene der Nitrat- und Nitritreduktase exprimiert und deren Proteine synthetisiert.

Daraus kann geschlossen werden, dass in *P. aeruginosa* die Gene der Nitratreduktase *NarGHJ*, ebenso wie die Gene der Nitritreduktase *NirS*, unter denitrifizierenden Bedingungen direkt von Dnr, über die Anr-Dnr-Kaskade induziert werden.

Im Falle der Nitritreduktase *NirS* übt der Regulator Anr nur über die Induktion von Dnr einen indirekten Einfluss auf die Gene beider Reduktasen aus. Ist Dnr nicht vorhanden, bewirkt auch das Vorhandensein von Anr (*dnr*-Mutante) keine Expression von *nirS*. Dies bestätigt die Promotoraktivitätsmessungen (*lacZ*-Fusion) von Arai *et al.* (1997), welche zeigten, dass die Induktion von *nirS* direkt durch Dnr, über die Anr-Dnr-Kaskade erfolgt.

Promotor-Untersuchungen von Krieger (2001) ergaben, dass eine direkte Aktivierung des Promotors der Nitratreduktase-Gene *narGHJ* durch Anr erfolgt und für eine Transkriptionsaktivierung von größerer Bedeutung ist als Dnr.

Die Proteomanalysen zeigen, dass die Expressionen von *narH* im Wildtyp (*anr* +, *dnr* +) und in der *anr*-Mutante mit pHA541 (*anr* -, *dnr* +) gleich stark sind. Beim Vergleich beider Proteinmuster konnte kein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge im Wildtyp und der komplementierten Mutante nachgewiesen werden. Dabei wird deutlich, dass Dnr den Regulator Anr ersetzen kann. Dies wird unterstützt durch das Ergebnis, dass Dnr direkt auf die Expression von *narH* einwirkt.

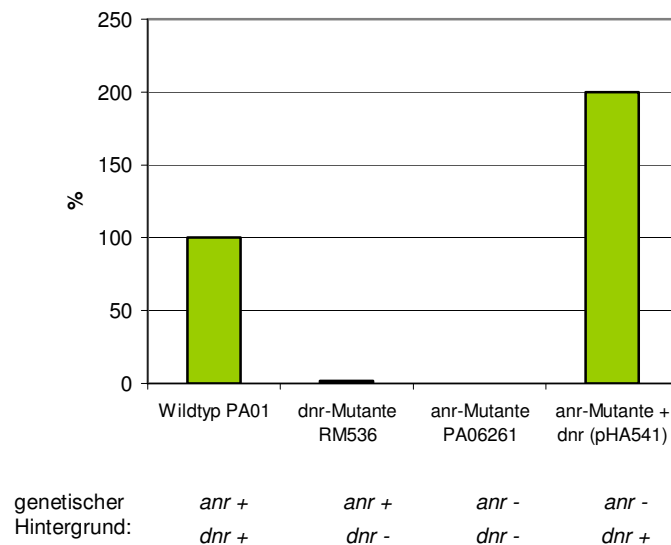
In der *dnr*-Mutante (*dnr* -, *anr* +), erfolgte bei einem Spot der Nitratreduktase eine 17,5-fach geringere Bildung von NarH, fehlte dann noch gleichzeitig Anr (*anr*-Mutante), wird die Bildung von NarH um das 100-fache verringert (Abb.53). Möglicherweise kann Anr die Transkription von *narH* im geringen Maße aktivieren, wenn Dnr nicht vorhanden ist.

Bei Untersuchungen der *dnr*-Expression wurde festgestellt, dass diese sehr stark NarL abhängig ist. In der *narL*-Mutante gingen die Reportergenaktivitäten (*dnr-lacZ*) sowohl aerob als auch anaerob auf Werte zurück, die auch mit promotorlosen Kontrollvektor erhalten wurden (Krieger, 2001). Da im Proteinmuster der *narL*-Mutante kaum NarH nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, ob die Expression von *narH* direkt über NarL oder ebenfalls über eine Art NarL-Dnr-Kaskade reguliert wird? Da *NirS* in der *narL*-Mutante in gleichen Mengen gebildet wurde wie im Wildtyp, und die Expression von *nirS* ebenfalls durch Dnr induziert wird, kann daraus geschlossen werden, dass in der *narL*-Mutante ausreichend Dnr vorhanden ist und NarL die Expression von *narH* direkt beeinflusst.

Die Proteomanalysen des Regulators *NirQ* zeigten, dass in der *dnr*-Mutante die Bildung des Proteins 62,5-fach reduziert wurde (Abb.54). Fehlt dann zusätzlich noch Anr in der Zelle (*anr*-Mutante), ist *NirQ* im 2D-Gel nicht mehr nachweisbar. In der mit *dnr*



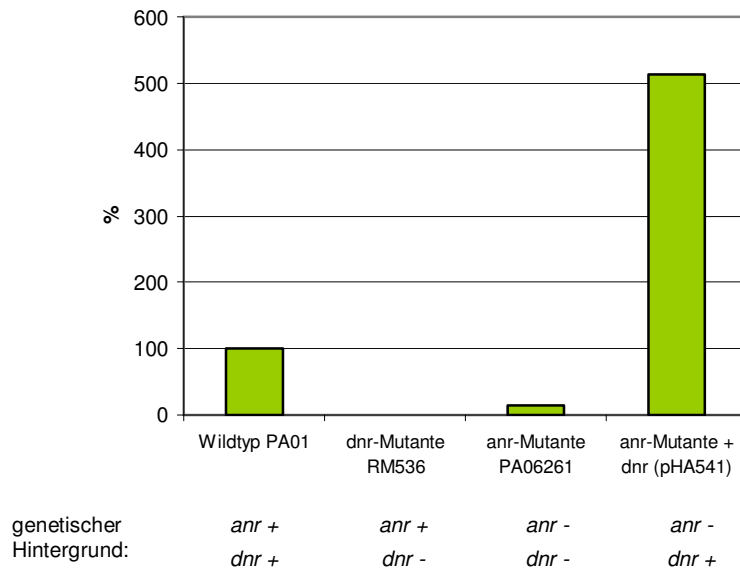
komplementierten *anr*-Mutante wird die Bildung von NirQ wieder induziert, und erreicht im Vergleich zum Wildtyp sogar die 2-fache Menge. In folgender Abbildung sind die Daten von NirQ zusammengefasst:



**Abb. 54: Zusammenfassende Auswertung der Bildung von NirQ in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PAO1 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an NirQ (grüne Balken). Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat

Da NirQ in *P. stutzeri* für anaerobes Wachstum unter denitrifizierenden Bedingungen notwendig ist (Jüngst und Zumft, 1992) und in *P. aeruginosa* die mit *dnr* komplementierte *anr*-Mutante, im Vergleich zur unkomplementierten *anr*-Mutante, wieder anaerobes Wachstum zeigte, schlossen Arai *et al.* (1997) daraus, dass die Expression von *nirQ* direkt durch Dnr, über die Anr-Dnr-Kaskade, reguliert wird. Die Proteomanalysen bestätigen, dass durch die Komplementation mit *dnr*, die Bildung von NirQ in der *Anr*-Mutante wieder vollständig induziert wird und Dnr direkt die Expression von *nirQ* reguliert. Ein ebenfalls direkter, jedoch sehr schwacher Einfluss von Anr kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da in der *dnr*-Mutante, im Vergleich zur *Anr*-Mutante, noch geringe Mengen an NirQ nachgewiesen werden konnten.

Über die Regulation von *hemF* ist bekannt, dass sowohl Anr, als auch Dnr einen direkten Einfluss auf die Expression ausüben (Rompf *et al.*, 1998). In folgender Abbildung sind die Daten der Proteomanalysen zusammengefasst:



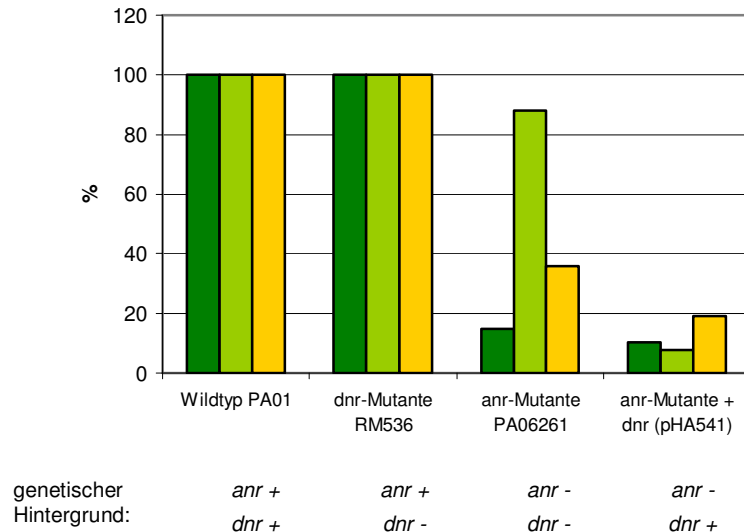
**Abb. 55: Zusammenfassende Auswertung der Bildung von HemF in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PAO1 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an HemF (grüne Balken). Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat.

Die Tatsache, dass Dnr direkt die Expression von *hemF* induziert, kann aufgrund der erfolgreichen Komplementation der *anr*-Mutante mit *dnr*, im Bezug auf die Bildung von HemF, und des Fehlens des Proteins in der *dnr*-Mutante bestätigt werden. Aus der fünffachen Steigerung der Bildung von HemF in der komplementierten Mutante kann geschlossen werden, dass in Anwesenheit von Anr die Induktion durch Dnr vermindert wird. Dies ist möglich, da beide Regulatoren um die gleiche Bindestelle konkurrieren.

Im Unterschied zu den Promotoraktivitätsmessungen (*hemF-lacZ*) von Rompf *et al.* (1998), kann durch die Proteomanalysen der direkte Einfluss von Anr nicht gezeigt werden. In der *dnr*-Mutante ist keine Bildung von HemF nachweisbar. Die Bildung von HemF in der Anr-Mutante, in welcher weder *anr* noch *dnr* exprimiert wird, steht ebenfalls im Widerspruch zu den Promotoraktivitätsmessungen (Rompf *et al.*, 1998). Auch hier wird deutlich, dass man von der Transkription eines Genes nicht auf die Menge vorhandenen Proteins in der Zelle schließen kann. Komplexe Prozesse wie die Transkription der DNA-Sequenz (weitere Regulationsmechanismen), die Translation der mRNA in Protein, dessen Transport zum Wirkungsort, die post-translationale Modifikation und der Abbau des Proteins nehmen Einfluß.

Die Proteine der Argininfermentation ArcABC werden in der mit *dnr* komplementierten *anr*-Mutante weit weniger gebildet als im Wildtyp. Auch im Vergleich mit der Synthese in den anderen Mutanten (Abb.56) wird deutlich, dass Dnr nicht an der Regulation der

Transkription der entsprechenden Gene beteiligt ist. Mit den Proteomanalysen konnten die Untersuchungen von Galimand *et al.* (1991) bestätigt werden, welche aussagen, dass die Gene der Argininfermentation direkt von Anr beeinflusst werden.



**Abb. 56: Zusammenfassende Auswertung der Bildung von ArcABC in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PA01 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an ArcA (■), ArcB (■) und ArcC (■). Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat.

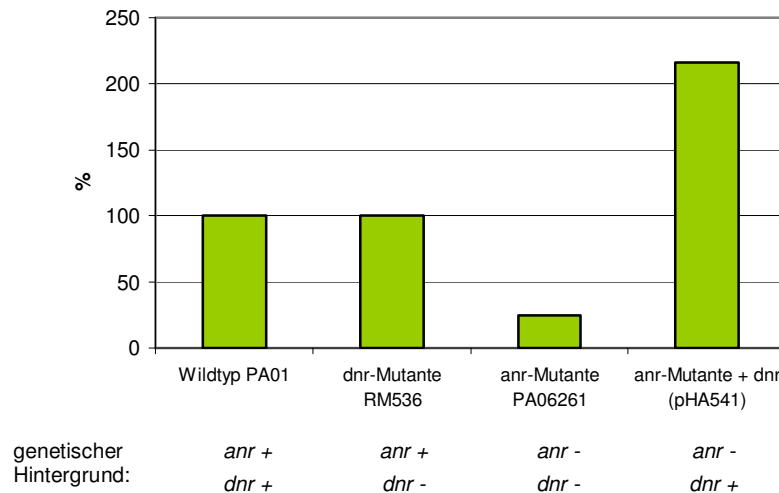
Die im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant veränderte Bildung von ArcB in der *anr*-Mutante PA06261 steht im Widerspruch zu den Daten von ArcA und ArcC. Die entsprechenden Gene *arcABC* werden zusammen in einem Operon transkribiert und demnach gleich reguliert. Dies zeigt sich deutlich in der mit *dnr* komplementierten *anr*-Mutante. Hier wird die Synthese aller drei Proteine in ähnlichem Umfang reduziert (Abb.56).

Im Proteinmuster der *narL*-Mutante ist eine bis zu 10-fache Steigerung der Argininfermentationsproteine ArcABC zu verzeichnen. Aufgrund der Tatsache, dass die *narL*-Mutante keine Denitrifikation durchführen kann und *P. aeruginosa* alternativ die Argininfermentation zum Überleben nutzen muss, kann nicht unterschieden werden, ob NarL in Anwesenheit von Nitrat die Expression der *arcABC*-Gene reprimiert, oder die Induktion ein sekundärer Effekt ist.

In folgender Abbildung (Abb.57) sind die Daten von KatA aus den untersuchten Mutanten zusammengestellt. Da das Protein in der Dnr-Mutante unverändert synthetisiert wurde sind in der entsprechenden Tabelle (Tab.26) die Werte nicht aufgeführt. Der DE-Wert für KatA

beträgt 1,64, wobei der RE-Wert im Wildtyp 4874 und in der Dnr-Mutante 2572 beträgt. Da die Induktion im Wildtyp nicht signifikant ist, werden die Werte der Dnr-Mutante ebenfalls als 100% angezeigt.

Im Vergleich zum Wildtyp wurde in der mit *dnr* komplementierten *anr*-Mutante die 2,16-fache Menge an KatA gebildet (Protein-Nr.3, Abb.52).



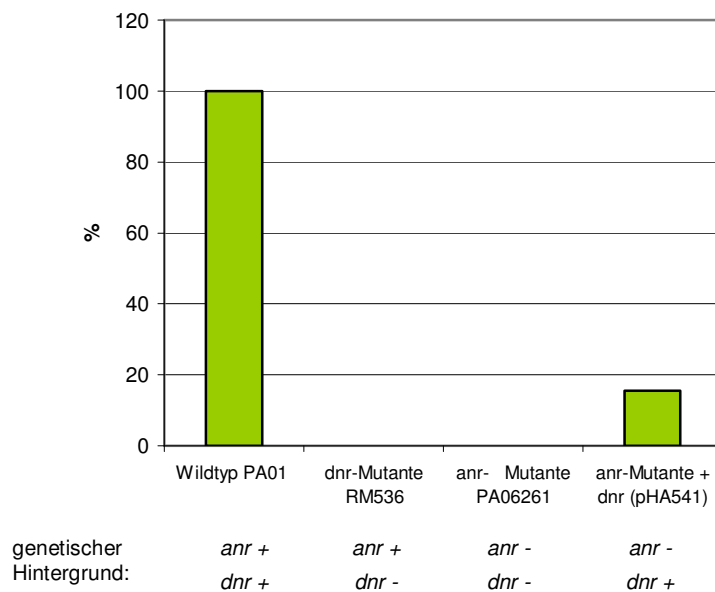
**Abb. 57: Zusammenfassende Auswertung der Bildung von KatA in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PAO1 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an KatA (grüne Balken). Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat.

Die gebildeten Mengen an KatA in den untersuchten Mutanten (Abb.57) zeigen, dass der Regulator Anr die Transkription von *katA* beeinflusst. Ist Anr in der Zelle vorhanden, werden unabhängig von Dnr, die gleichen Mengen KatA gebildet wie im Wildtyp. Erst wenn beide Regulatoren fehlen, wird die Synthese um 75% gesenkt. Wird allerdings nur Dnr in der Zelle gebildet, kann dieses Anr ersetzen und die Produktion wieder auf das Wildtyp-Niveau steigern. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die bioinformatischen Analysen, welche für den Promotorbereich von *katA* eine potentielle Anr-Bindestelle vorhersagen konnten.

Aufgrund des Ergebnisses, dass sich in Abhängigkeit von Sauerstoff die Bildung von KatA in Vollnährmedium LB nicht verändert, d.h. KatA unter anaeroben Bedingungen nicht induziert wird, liegt die Vermutung nahe, dass neben Anr weitere Regulatoren Einfluß auf die Transkription von *katA* nehmen. Untersuchungen von Hassett *et al.* (1996 b) zeigten, dass der Eisen-Regulator Fur in *P. aeruginosa* die Expression der Katalase KatA positiv beeinflusst. Allerdings wird hier eine indirekte Regulation vermutet.

Ein Gene-Alignent mit der TIGR-Datenbank ergab für das hypothetische Protein PA5496 eine 49,3%-ige Ähnlichkeit zu einer Ribonucleotid-Reduktase von *Halobacterium* sp. NRC-1. In der PRODORIC-Datenbank wird für PA5497 eine 41,7%-ige Ähnlichkeit ebenfalls zu einer Ribonucleotid-Reduktase in *Sulfolobus solfataricus* angegeben.

Beim Vergleich von Wildtyp mit der *dnr* komplementierten *anr*-Mutante wird deutlich, dass das hypothetische Protein PA5496 (Protein-Nr. 17, Abb.52) 6,45-fach weniger produziert wurde. Vergleicht man diese Daten mit den Ergebnissen der anderen Mutanten entsteht folgendes Bildungsschema (Abb.58):



**Abb. 58: Zusammenfassende Auswertung der Bildung von PA5496 in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PA01 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an PA5496 (grüne Balken). Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat.

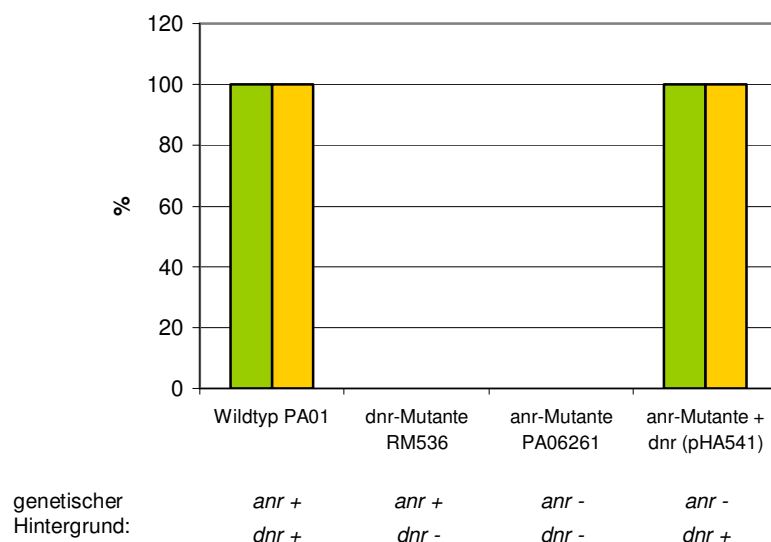
Das Protein PA5496 erfährt im Vergleich zu aeroben Bedingungen während der Denitrifikation eine 100%-ige Induktion. Dabei übernimmt Dnr die Schlüsselposition. Wird kein Dnr in der Zelle gebildet, kann in den 2D-Gelen kein PA5496 detektiert werden. Ist Dnr vorhanden (*anr*-Mutante + *dnr* pHA541) wird die Synthese des Proteins induziert, das Maximum wird jedoch nur dann erreicht, wenn auch Anr vorhanden ist (Wildtyp). Anr allein kann die Bildung von PA5496 nicht induzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transkription von PA5496 unter anaeroben Bedingungen vermutlich über die Anr-Dnr-Kaskade reguliert wird und wahrscheinlich auch von Anr direkt abhängig ist. Da die Gene PA5496 und PA5497 wahrscheinlich in einem Operon transkribiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass Anr und Dnr über die im Promotorbereich von PA5497 detektierte potentielle Anr-Bindestelle auch Einfluß auf die Transkription von PA5496 nehmen.

Vorhergehende Untersuchungen ergaben ebenfalls eine Abhängigkeit des Proteins von NarL, dem Transkriptionsfaktor des Regulationssystems NarXL, dessen Sensor NarX Nitrat in der Umgebung detektiert. In der *narL*-Mutante erfolgte im Vergleich zum Wildtyp eine Verminderung der Proteinmenge auf 9,3%.

Die Abhängigkeit dieses Proteins von den Regulatoren der Denitrifikation, Anr, Dnr und NarL, lassen den Schluß zu, dass PA5496 ein, für den aneroben Stoffwechsel mit Nitrat, wichtiges Protein in *P.aeruginosa* ist.

### 3.1.9.2 Proteine ohne potentielle Anr-Bindestelle im Promotorbereich der entsprechenden Gene

Beim Vergleich der Proteinmuster wird deutlich, dass die assimilatorische Nitritreduktase NirB, das gleiche Regulationsschema aufweist, wie die dissimilatorische Nitritreduktase NirS. Auf die Expression der dazugehörigen Gene hatte NarL keinen Einfluss, weiterhin wird NirB unter denitrifizierenden Bedingungen in der mit *dnr* komplementierten *anr*-Mutante zu gleichem Maße gebildet wie im Wildtyp (Abb.59). Ebenso erfolgt ohne Dnr keine Induktion des dazugehörigen Gens, unabhängig von der Anwesenheit von Anr (Abb.59). Das würde bedeuten, dass die Expression von *nirB* direkt durch Dnr induziert wird und die Regulation möglicherweise über die Anr-Dnr-Kaskade erfolgt.



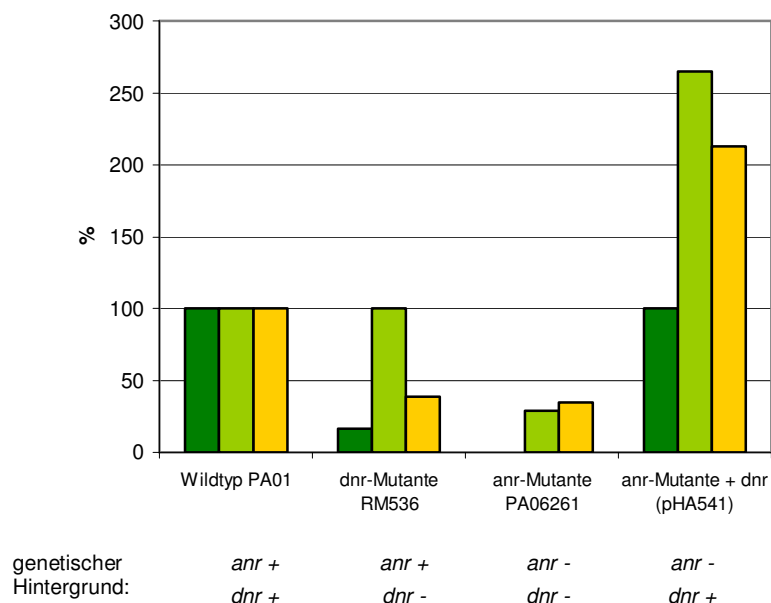
**Abb. 59: Zusammenfassende Auswertung der Bildung von NirB und NirS in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PA01 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an NirB (■) und NirS (■). Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat.

Die Tatsache, dass für das *nirBD*-Operon keine potentielle Anr-Bindestelle vorhergesagt werden konnte, steht im Widerspruch zu der anhand der Proteomanalysen postulierten Regulation von *nirB*.

Auch beim Vergleich von theoretischen pI und Molekulargewicht mit dem praktischen Werten ist NirB ein Protein, welches praktisch sehr stark von seinem theoretischen Werten abweicht (Kapitel 3.1.2.4). Die Ergebnisse suggerieren, dass es sich bei dem Protein vielleicht gar nicht um NirB handelt. Die Kontrolle der MALDI-Daten zeigte jedoch, dass es sich bei dem identifizierten Proeinflecken eindeutig um die assimilatorischen Nitritreduktase handelt. Nach Aufnahme des Massenspektrums ergab die Suche in der Mascot-Datenbank (<http://www.matrix-science.com>) einen einzigen signifikanten Treffer (Score>63), mit einen Score von 175. Bei diesem Treffer handelte es sich um das Protein NirB.

Von OprE ist bekannt, dass es unter anaeroben Bedingungen induziert wird (Yamano *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen von Yamano *et al.* (1998) ergaben, dass der alternative Sigma Faktor RpoN, neben anderen, bis jetzt noch unbekannten regulatorischen Proteinen, an der Regulation beteiligt ist.

Die Proteomanalysen zeigen, dass sowohl Anr als auch Dnr die Expression von *oprE* beeinflussen (Abb.60). In der *anr*-Mutante, wo weder Anr noch Dnr aktiv ist, ist weniger OprE nachweisbar, als im Wildtyp. Nach der Komplementation der *anr*-Mutante mit dem *dnr*-Gen ist eine Zunahme des Proteins zu verzeichnen, welche ca. dem 2-fachen Wert an OprE in Wildtypzellen entspricht. Da in der Dnr-Mutante mehr OprE nachgewiesen werden kann als in der *anr*-Mutante, jedoch weniger als im Wildtyp, übt vermutlich Anr ebenfalls einen direkten Einfluss auf die Expression von *oprE* aus.



**Abb. 60: Zusammenfassende Auswertung der Bildung von OprE in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PAO1 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an OprE. Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat. Die an drei verschiedenen Stellen im Gel identifizierten OprE-Proteine (multipler Spot) wurden einzeln durch drei Balken (■, ■ und ■) dargestellt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl Anr als auch Dnr, neben RpoN und weiteren unbekannten Regulatoren, an der Regulation von *oprE* beteiligt sind. Bioinformatische Untersuchungen des Promotorbereiches konnten jedoch keine potentielle Anr-Bindestelle identifizieren. Weiter Experimente, z.B. Reporterfusionen, sind nötig, um die Proteomanalysen zu bestätigen.

Beide hypothetischen Proteine PA1677 und PA3326 werden in der mit *dnr* komplementierten *anr*-Mutante im gleichen Maße gebildet wie in Wildtypzellen (Tab.31). Daraus kann geschlossen werden, dass Anr auf die Expression der Gene keinen Einfluss hat. In der *anr*-Mutante ohne *dnr*-Gen werden jedoch beide Proteine stärker synthetisiert als im Wildtyp (Abb.61).



**Abb. 61: Zusammenfassende Auswertung der Bildung der hypothetischen Proteine PA1677 und PA3326 in Abhängigkeit von *anr* und *dnr*.** Die beim Vergleich von Wildtyp PAO1 mit verschiedenen *Pseudomonas*-Mutanten in 2D-Gelen detektierte Mengen an PA1677 (■) und PA3326 (■). Die im Wildtyp gebildete Menge entspricht 100%. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Nitrat.



Diese Daten zeigen, dass Dnr die Transkription der entsprechenden Gene negativ reguliert. Unabhängig von Anr, ist mehr Protein in den 2D-Gelen nachweisbar, wenn *dnr* in der Zelle nicht transkribiert wird (Abb.61). Da im Promotorbereiche beider Gene keine potentielle Anr-Bindestelle detektiert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass Dnr nicht direkt die Expression reprimiert, sondern die Regulation indirekt über ein weiterer Regulator erfolgt, welcher durch Dnr induziert wird und über die Transkription die Bildung beider Proteine verhindert.

### 3.2 Charakterisierung der dissimilatorischen Nitratreduktasen in *P. aeruginosa*

Während der Infektion der Lunge durch *P. aeruginosa* bildet der Erreger biofilmartige Mikrokolonien im Mukus, welcher auf den Zellen des Lungenepitheliums von CF-Patienten entsteht. Durch Messungen des Sauerstoffgehaltes wurde nachgewiesen, dass sich in diesem Mukus langsam ein anoxxygenes Milieu einstellt (Worlitzsch et al., 2002). Unter diesen Bedingungen kann *P. aeruginosa* die Fermentation von Arginin oder bei Vorhandensein von Nitrat oder Nitrit die Denitrifikation zum Überleben nutzen.

Da weiterhin im Sputum und im Speichel, sowohl von gesunden Menschen, als auch von CF-Patienten, im Durchschnitt 144 – 320 µmol/l Nitrat und Nitrit nachgewiesen werden konnte (Grasemann et al., 1998), geht man davon aus, dass *P. aeruginosa* die Denitrifikation zur Energiegewinnung nutzt.

Der erste Schritt dieses Stoffwechselweges, die Umsetzung von Nitrat zu Nitrit, erfolgt durch die Nitratreduktase. Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, besitzt *P. aeruginosa* drei verschiedene Enzyme für diese Reaktion, die cytoplasmatische Nitratreduktase NarGHI, die periplasmatische NapABC und die assimilatorische Nitratreduktase Nas, wobei diese nur für die Assimilation genutzt wird.

Untersuchungen zeigten, dass die periplasmatische Nitratreduktase in *E. coli* unter geringen Nitratkonzentrationen die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysiert und somit anaerobes Wachstum ermöglicht (Stewart et al., 2002). Die von Dr. M. Eschbach durchgeführte Analysen der Promotoraktivitäten von *narGHI* und *napABC* in *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von der Nitratkonzentration zeigten, dass die Gene *napABC* unter geringen Nitratkonzentrationen (250 µM Nitrat) am stärksten exprimiert werden. Die maximale Genexpression der Gene der cytoplasmatischen Nitratreduktase ist jedoch im millimolaren Bereich (9 mM Nitrat) zu finden.

Da die Nitratkonzentrationen in der Lunge eher im mikromolaren Bereich liegen, kann hier eine mögliche Funktion der bisher in *P. aeruginosa* noch funktionell unbekannten NapABC zu finden sein.

Im Folgenden werden die beiden dissimilatorischen Nitratreduktasen NarGHI und NapABC von *P. aeruginosa* hinsichtlich ihrer Funktion und während der Biofilmbildung untersucht.

### 3.2.1 Ausschalten der chromosomalen Nitratreduktasegene *napABCDEF* und *narGHJ* in *P. aeruginosa*

Um den Einfluss beider Nitratreduktasen auf die Denitrifikation und die Biofilmbildung zu untersuchen, wurden mittels homologer Doppelrekombination „Knockout“-Mutanten hergestellt. Dabei wurden die Zielgene durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt (siehe Kap. 2.13.3).

Im Fall der *nap*-Mutante wurde das gesamte Operon, bestehend aus *napABCDEF*, entfernt (Abb.62).

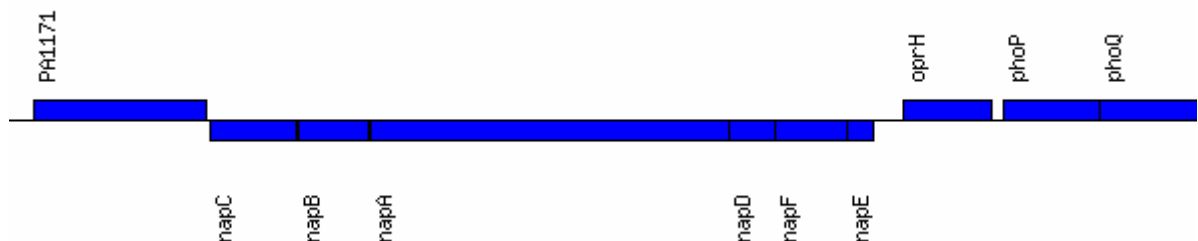


Abb.62: Chromosomale Anordnung der Gene des Operons der periplasmatischen Nitratreduktase NapABC und benachbarte Gene (PRODORIC-Datenbank).

Am Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) der Untereinheit NapA findet die Reduktion von Nitrat zu Nitrit statt, wobei die benötigten Elektronen über die Cytochrome NapC und NapB geliefert werden (Moreno-Vivian et al., 1999). Die Proteine NapDEF gehören ebenfalls zur periplasmatischen Nitratreduktase, über ihre genaue Funktion in *P. aeruginosa* liegen jedoch keine Informationen vor. Um sicher zu gehen, dass es durch die einzelnen Untereinheiten dieser Reduktase zu keiner Umsetzung von Nitrat zu Nitrit kommt, wurde das gesamte Operon entfernt.

Der *P. aeruginosa* *nar*-Locus (Abb.63) enthält zum einen das *narXL*-Operon, das für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem kodiert. Zweitens die Gene *narK*<sub>1</sub> und *narK*<sub>2</sub>, deren Produkte analog zu *E. coli narK* (Noji *et al.*, 1989; DeMoss *et al.*, 1991) vermutlich als Nitrat/Nitrit-Antiporter fungieren. Und schließlich folgen die Strukturgene der Nitratreduktase *narGHI* selbst sowie *narJ*, das die Assemblierung der Untereinheiten unterstützt (Sodergren *et al.*, 1988; Blasco *et al.*, 1998). Die Gene *narK1K2GHIJ* werden in einem Operon transkribiert (Krieger, 2001). Um den Transport von Nitrat, bzw. Nitrit nicht zu beeinflussen, wurden in diesem Falle nur die Strukturgene *narGHIJ* deletiert.



Abb.63: Chromosomale Anordnung der Gene des Operons der periplasmatischen Nitratreduktase NapABC und benachbarte Gene (PRODORIC-Datenbank).

Bei der Herstellung der Doppelmutante wurden sowohl die Gene der periplasmatischen Nitratreduktase *napABCDEF*, als auch *narGHIJ*, die Strukturgene der cytoplasmatischen Nitratreduktase, entfernt. Die Strategie für die chromosomalen „Knockouts“ ist in Kapitel 2.13.3 ausführlich beschrieben.

Tab.32: Beschreibung der konstruierten chromosomalen *P.aeruginosa* „Knockout“ Stämme und zugehörige Vektoren

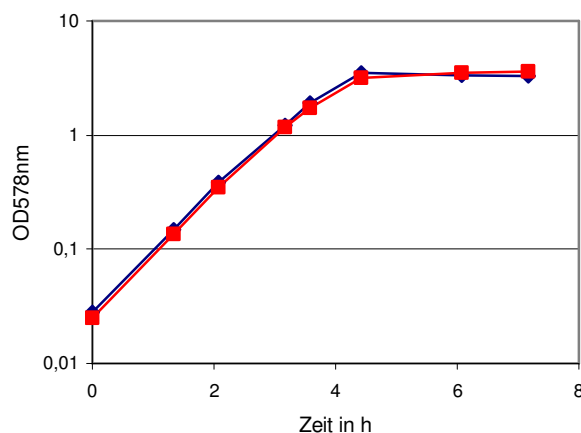
| Mutante                      | entfernte Gene             | Donor-stamm | Suicide-Vektor pEX18Ap mit dem „Knockout“-Konstrukt | „Knockout“-Stämme mit der Gentamycin-Resistenzkassette | „Knockout“-Stämme nach Entfernung der Gentamycin-Resistenzkassette |
|------------------------------|----------------------------|-------------|---|--|--|
| <i>nap</i> -Mutante          | <i>napABCDEF</i>           | PAO1        | pNQ01   | PANQ01   | PANQ02   |
| <i>nar</i> -Mutante          | <i>narGHIJ</i>             | PAO1        | pNQ02   | PANQ03   | PANQ05   |
| <i>napnar</i> -Doppelmutante | <i>napABCDEF + narGHIJ</i> | PANQ02      | pNQ02   | PANQ04   | PANQ06   |

Der Nachweis über die Integration der Gentamycin-Resistenzkassette an die richtige Position im Genom der „Knockout“-Mutanten (Tab.32) erfolgte durch einen Southern-Blot (Daten nicht gezeigt).

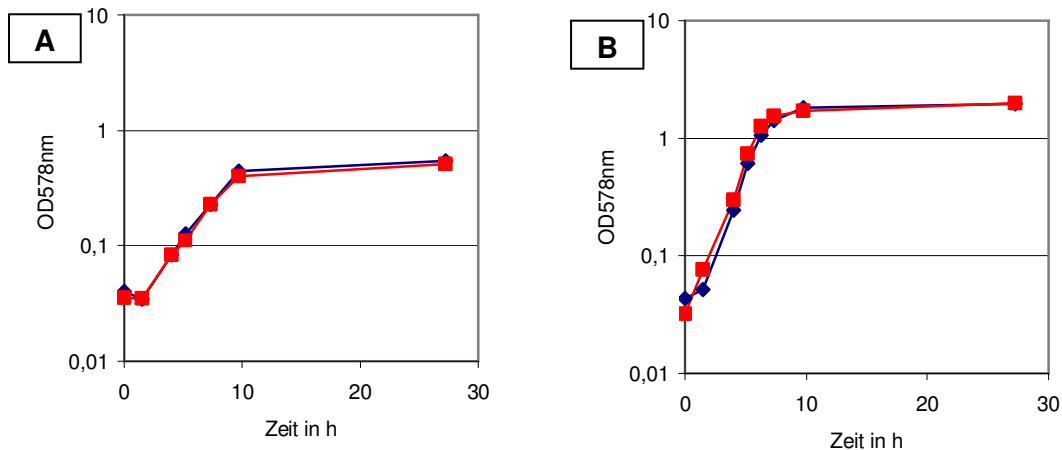
Für die weiteren Untersuchungen der einzelnen Mutanten wurde abschließend die Gentamycin-Resistenzkassette mittels Flp-Rekombinasebehandlung aus dem Genom entfernt (siehe Kap. 2.13.3.1).

### 3.2.2 Bedeutung der Nitratreduktasen NapABC und NarGHI für die Denitrifikation

Nach der Bestätigung des erfolgreichen Ausschaltens der Operons der Nitratreduktasen durch den Southern-Blot wurde die hergestellte Mutante PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) auf ihr Verhalten während des aeroben und anaeroben Wachstums mit Nitrat und Nitrit getestet. Zum Vergleich wurde der PAO1 Wildtyp unter den gleichen Bedingungen vermessen. In Abb. 64 und 65 sind die Wachstumskurven dargestellt. Sowohl unter aeroben Bedingungen als auch während anaeroben Wachstums mit Nitrat oder Nitrit, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypkulturen und der *nap*-Mutante zu verzeichnen. Die in den logarithmischen Wachstumsphasen ermittelten Generationszeiten des Wildtyps und der Mutante betrugen aerob 37,4 min bzw. 37,3 min, anaerob mit Nitrit 134,5 min bzw. 139,5 min und anaerob mit Nitrat 64,1 min bzw. 70 min.



**Abb.64: Wachstumskurven der Stämme PAO1 Wildtyp (—◆—) und PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) (—■—) unter aeroben Bedingungen in LB-Medium.** Im Diagramm sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Kulturen des jeweiligen Stammes dargestellt.



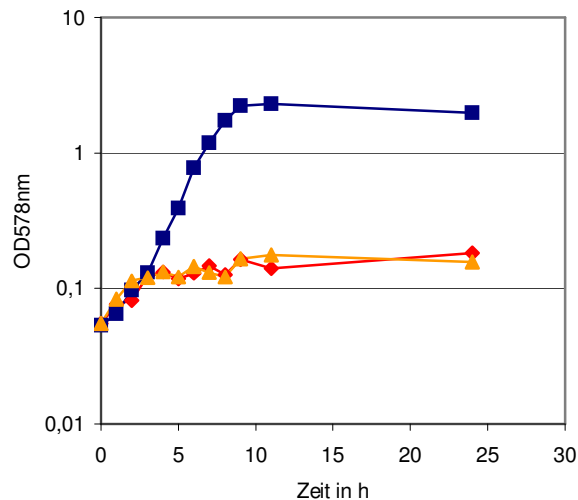
**Abb.65: Wachstumskurven der Stämme PAO1 Wildtyp (—◆—) und PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) (—■—) unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit 50 mM KNO<sub>3</sub> (B), bzw. 10 mM NaNO<sub>2</sub> (A). Im Diagramm sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Kulturen des jeweiligen Stammes dargestellt.**

Daraus kann geschlossen werden, dass in *P. aeruginosa* die periplasmatische Nitratreduktase NapABC weder unter aeroben Bedingungen noch während der Denitrifikation eine essentielle Rolle spielt.

Für die Mutanten PANQ05 ( $\Delta narGHIJ$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) konnte mittels Southern-Blot ebenfalls ein korrekter „Knockout“ nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da die Synthese der cytoplasmatischen Nitratreduktase NarGHI durch molekularen Sauerstoff inhibiert wird und ihre Funktion allein in der Reduktion von Nitrat zu Nitrit während der Denitrifikation begründet liegt, wurde für die Mutante PANQ05 ( $\Delta narGHIJ$ ) ausschließlich ein Wachstums-Phänotyp unter anaeroben Bedingungen erwartet. Durch Wachstumstests konnte dies bestätigt werden.

Während des Wachstums unter denitrifizierenden Bedingungen wächst die Mutante anfänglich wie der Wildtyp, stellt jedoch das logarithmische Wachstum ab einer OD<sub>578</sub> von 0,13 ein und erreicht nach 24 Stunden nur eine OD<sub>578</sub> von 0,18. Der Wildtyp wächst innerhalb der gleichen Zeit bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1,97 (Abb. 66). Das bei der Mutante am Anfang zu verzeichnende Wachstum ist auf den Verbrauch von Restsauerstoff im Medium zurückzuführen. Unter aeroben Bedingungen wuchs die Mutante PANQ05 wie der Wildtyp PAO1 (Daten nicht gezeigt).



**Abb.66: Wachstumskurven der Stämme PAO1 Wildtyp (—■—), PANQ05 ( $\Delta narGHIJ$ ) (—◆—) und PANQ06 ( $\Delta napABCDE$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) (—▲—) unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit 50 mM  $KNO_3$ . Im Diagramm sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Kulturen des jeweiligen Stammes dargestellt.**

Die Doppelmutante PANQ06 ( $\Delta napABCDE$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) zeigte unter denitrifizierenden Bedingungen das gleiche Verhalten wie die *nar*-Mutante PANQ05. Sie erreichte ebenfalls nach 24 Stunden nur eine  $OD_{578}$  von 0,16 (Abb. 66).

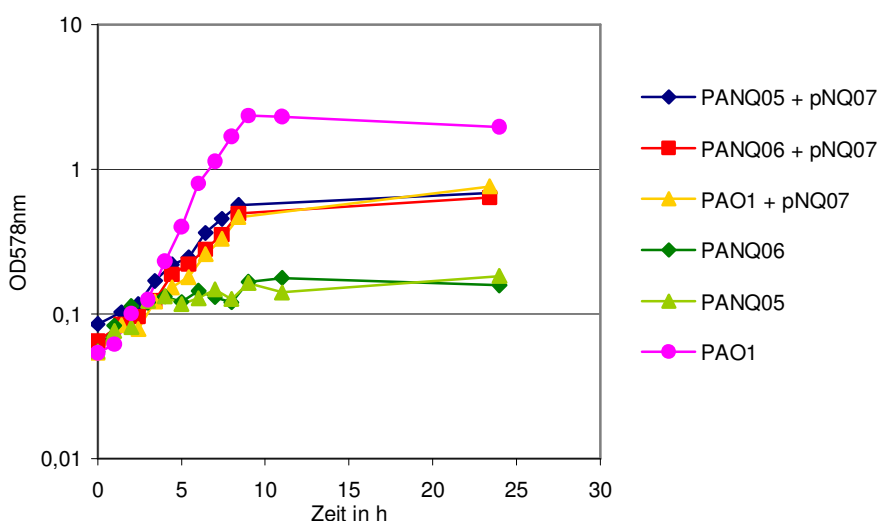
Aufgrund des Wachstumsverhaltens der Mutanten wird deutlich, dass in *P. aeruginosa* allein die cytoplasmatische Nitratreduktase NarGHI das Nitrat während der Denitrifikation zu Nitrit umsetzen kann. Fehlt diese Reduktase, wird der erste Schritt der Denitrifikation verhindert und es kommt zu keiner Energiegewinnung und keinem Wachstum unter anaeroben Bedingungen. Die periplasmatische Nitratreduktase NapABC kann in diesem Falle in *P. aeruginosa* die Funktion von NarGHI nicht übernehmen.

### 3.2.3 Komplementation der Mutanten PANQ05 ( $\Delta narGHIJ$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDE$ , $\Delta narGHIJ$ ) mit einem Cosmid, welches die Gene des *nar*-Operons enthält

Durch Komplementation von Mutanten mit einer Cosmid-Genbank aus *P. aeruginosa* ATCC 17933 (Schobert, 1999) können Cosmide isoliert werden, die einen Wachstumsdefekt einer Mutante komplementieren.

Für die Komplementation der hergestellten Nitratreduktase-Mutanten wurde ein Cosmid benötigt, welches die Information der cytoplasmatischen Nitratreduktase NarGHIJ enthält. Da das Operon dieser Nitratreduktase *narK<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHIJ* direkt stromaufwärts des

*narXL*-Operons liegt, wurde die NarL-Mutante (Krieger, 2001) für die Gewinnung des komplementierenden Cosmides genutzt (Kapitel 2.11.4). Dieses Cosmid pNQ07 wurde mittels Zweipunkt Kreuzung in die Stämme PANQ05 ( $\Delta narGHIJ$ ), PANQ06 ( $\Delta napABCDE$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) und zur Kontrolle in den Wildtyp PAO1 übertragen. Die durchgeführten Wachstumstests unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor zeigten folgendes Ergebnis:



**Abb.67: Wachstumskurven der Stämme PAO1 (Wildtyp), PANQ05 ( $\Delta narGHIJ$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDE$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) mit und ohne Cosmid pNQ07, welches wahrscheinlich die Gene des *nar*-Operons trägt.** Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit 50 mM  $KNO_3$  und die Kulturen mit den Cosmid-tragenden Stämmen enthielten zusätzlich 100  $\mu g/ml$  Tetracyclin. Im Diagramm sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Kulturen des jeweiligen Stammes dargestellt.

| Stamm          | Generationszeit in min |
|----------------|------------------------|
| PAO1 Wildtyp   | 95,4                   |
| PAO1 + pNQ07   | 164,4                  |
| PANQ05 + pNQ07 | 175,8                  |
| PANQ06 + pNQ07 | 170,4                  |

**Tab.33: Errechnete Generationszeiten der Stämme PAO1 (Wildtyp), PANQ05 ( $\Delta narGHIJ$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDE$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) mit und ohne Cosmid pNQ07, welches wahrscheinlich die Gene des *nar*-Operons trägt.** Die dazugehörigen Wachstumskurven sind in Abb.67 dargestellt.

Aufgrund des nötigen Selektionsdruckes (Antibiotika) erreicht der Wildtypstamm mit dem Cosmid nicht die gleiche Generationszeit wie der Wildtyp ohne Cosmid (Abb.67, Tab.33). Jedoch ist deutlich zu erkennen, dass die Mutanten, welche das Cosmid enthalten,

ebenso wachsen wie der Wildtyp mit gleichem Cosmid. Die Generationszeiten aller drei Stämme liegen zwischen 164,4 und 175,8 Minuten. Im Gegensatz dazu, zeigen die Mutanten PANQ05 und PANQ06 unter diesen Inkubationsbedingungen kaum Wachstum. Daraus kann geschlossen werden, dass die auf dem Cosmid codierte cytoplasmatische Nitratreduktase NarGHIJ sowohl die *nar*-Mutante ( $\Delta narGHIJ$ ) als auch die Doppelmutante ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) komplementieren kann und somit Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat ermöglicht. Dies verdeutlicht ebenfalls, dass die periplasmatische Nitratreduktase NapABC nicht essentiell für die Denitrifikation in *P. aeruginosa* ist.

### **3.2.4 Wachstum der chromosomalen *P. aeruginosa* Mutante PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) während des Übergangs von aeroben zu denitrifizierenden Bedingungen**

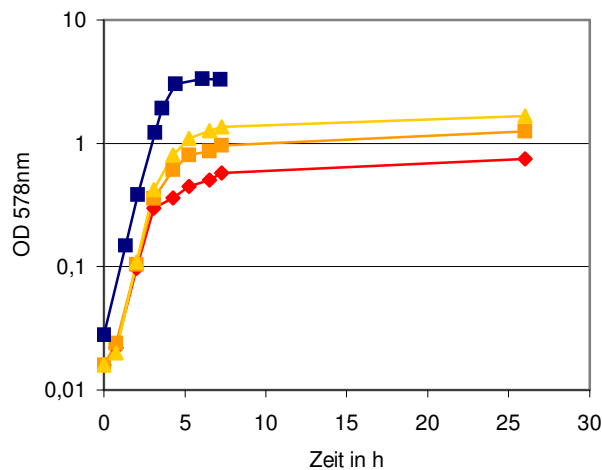
Eine mögliche Rolle der periplasmatischen Nitratreduktase ist die aerobe Denitrifikation, verbunden mit der Adaption an anaerobe Bedingungen. In *Thiosphaera pantotropha* erleichtert sie das Überleben unter mikroaerophilen Bedingungen und fördert deutlich den Übergang zum anaeroben Stoffwechsel (Bell et al., 1990; Moreno-Vivian et al, 1999).

Um dies für *P. aeruginosa* zu untersuchen, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: eine Schottflasche mit 350 ml Volumen wurde mit 200 ml LB-Medium gefüllt, beimpft, luftdicht verschlossen und schüttelnd inkubiert. Ein seitlicher Stutzen, verschlossen mit einem Gummistopfen diente der sauerstofffreien Entnahme einer Probe, deren optische Dichte im Photometer (578 nm) gemessen wurde.

Anfänglich nutzt *P. aeruginosa* den vorhandenen Sauerstoff als Elektronenendakzeptor und gewinnt seine Energie durch aerobe Atmung. Mit zunehmender Zellzahl und dem Verbrauch von Sauerstoff stellen sich mikroaerophile Bedingungen ein, welchen sich dann anaerobe Wachstumsbedingungen anschließen. Ist dann kein alternativer Elektronenakzeptor vorhanden (z.B. Nitrat), ist ein Wachstum nicht mehr möglich. Bei Anwesenheit von Nitrat stellt PAO1 seinen Stoffwechsel auf anaerobe Atmung (Denitrifikation) um.

In folgendem Diagramm (Abb. 68) sind Wachstumskurven von *P. aeruginosa* in Schottflaschen mit LB ohne Nitrat und unterschiedlichen Medium-Luft-Verhältnissen dargestellt. Eine Flasche wurde mit 200 ml LB gefüllt, eine zweite mit 150 ml und die dritte mit nur 100 ml LB. Aufgrund dieser unterschiedlichen Volumina standen den Kulturen auch unterschiedliche Mengen an Sauerstoff zur Verfügung. Zum Vergleich mit diesen „Shift“-Kulturen wurde die Wachstumskurve von PAO1 in einer aeroben Kultur mit aufgeführt.





**Abb.68: Wachstumskurven des Stammes PAO1 (Wildtyp) während eines Wechsels („Shift“) von aeroben über mikroaeroben bis zu anaeroben Bedingungen in LB-Medium.** Drei Kulturen wurden mit unterschiedlichen Volumina an LB (200ml (—◆—), 150ml (—■—), 100ml (—▲—)) gefüllt, luftdicht verschlossen und inkubiert. Zum Vergleich erfolgte die Darstellung einer Wachstumskurve unter aeroben Bedingungen (—■—).

Da zu Beginn des Versuches allen drei „Shift“-Kulturen, ebenso wie der aerobe Kultur, ausreichend Sauerstoff zur Verfügung stand, zeigte *P. aeruginosa* in den ersten drei Stunden in allen Kulturen keinen signifikanten Unterschied im logarithmischen Wachstum. Folgende Generationszeiten konnten in dieser Phase ermittelt werden:

„Shift“ mit 200 ml LB:  $g = 37,2$  min,  
 „Shift“ mit 150 ml LB:  $g = 36$  min,  
 „Shift“ mit 100 ml LB:  $g = 32$  min und  
 aerob:  $g = 35,4$  min.

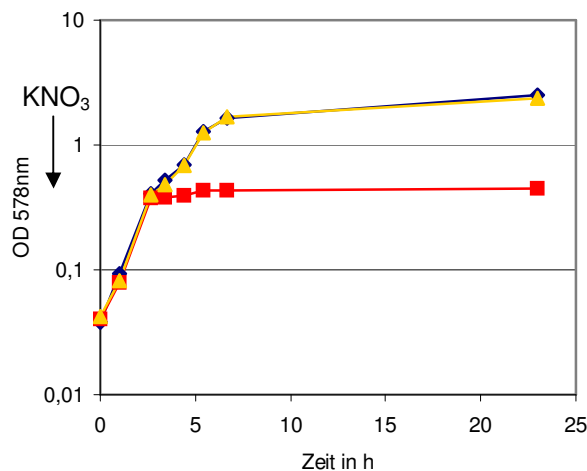
Ebenso wie in der aeroben Kultur teilten sich auch in den verschlossenen „Shift“-Kulturen die Zellen im Durchschnitt alle 35,2 min.

Nach ca. 3 h verlangsamte sich das Wachstum der Kultur, die den geringsten Anteil an Sauerstoff hat (200 ml LB). Die Generationszeit der Zellen in dieser Kultur betrug in den folgenden 4 Stunden 4 h und 37 min. Die Zellen der beiden anderen „Shift“-Kulturen reduzierten erst nach 4 h ihre Generationszeiten. Innerhalb der nächsten drei Stunden benötigten die Zellen für eine Zellteilung 4 h und 59 min, bzw. 4 h und 13 min. Zu diesen Zeitpunkten scheint der Hauptanteil des Sauerstoffs verbraucht zu sein und ein mikroaerobes Milieu herrscht vor. Die aerobe Kultur mit stetiger Sauerstoffverfügbarkeit wächst logarithmisch weiter bis zu einer  $OD_{578nm}$  von 3,3.

Nachdem der Restsauerstoff der „Shift“-Kulturen ebenfalls verbraucht ist und kein alternativer Elektronenakzeptor vorliegt ist kein weiteres logarithmisches Wachstum

möglich. Je nach anfänglicher Sauerstoffverfügbarkeit betragen die  $OD_{578nm}$  nach 24 Stunden 0,748, 1,258 und 1,67.

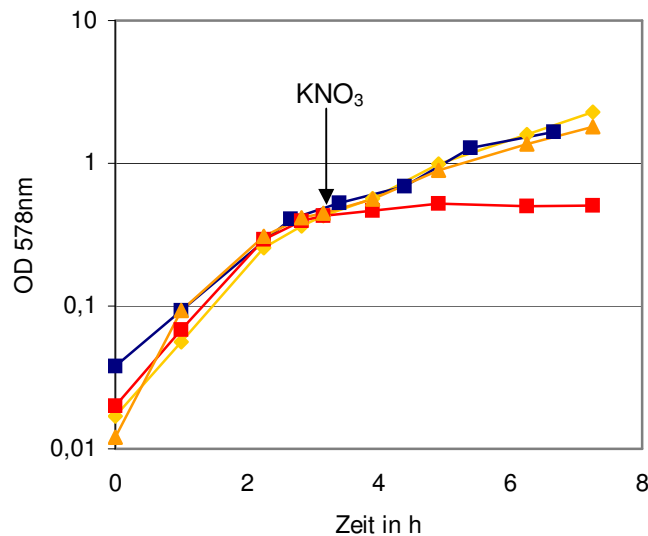
Enthält das Medium während dieses Versuches Nitrat, nutzt *P. aeruginosa* nach dem Verbrauch von Sauerstoff (nach ca. 3 h) dieses als Elektronenakzeptor und gewinnt mittels Denitrifikation Energie (Abb. 69). Dabei macht es keinen Unterschied, ob Nitrat von Beginn an im Medium vorhanden ist (blauer Graph), oder erst bei  $O_2$ -limitierenden Bedingungen zugegeben wird (gelber Graph).



**Abb.69: Wachstumskurven des Stammes PAO1 (Wildtyp) während eines Wechsels von aeroben über mikroaeroben bis zu anaeroben Bedingungen in LB-Medium** ohne Nitrat (—■—), mit 50 mM  $KNO_3$  (—◆—) und mit 50 mM  $KNO_3$ , welches erst zum Zeitpunkt  $t = 2,66$  h (Pfeil) zugegeben wurde (—▲—). Die drei Kulturen wurden mit 200 ml Medium gefüllt, luftdicht verschlossen und inkubiert.

Um den Einfluss der periplasmatischen Nitratreduktase unter mikroaeroben Bedingungen zu untersuchen, wurde das „Shift“-Experiment mit der *nap*-Mutante PANQ02 wiederholt (Abb.70). Die Daten zeigen, dass sich die *nap*-Mutante PANQ02 unter diesen Bedingungen ebenso verhält wie der Wildtyp. Auch die erst verspätete Zugabe von Nitrat (oranger Graph) zeigte keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Mutante während  $O_2$ -limitierender Bedingungen.

Das bedeutet, dass beim Übergang vom aeroben zum anaeroben Milieu das Fehlen der periplasmatischen Nitratreduktase in diesem Experiment keinen Einfluss auf Wachstum von *P. aeruginosa* hat.



**Abb.70: Wachstumskurven des Stammes PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) während eines Wechsels von aeroben über mikroaeroben bis zu anaeroben Bedingungen in LB-Medium ohne Nitrat (—■—), mit 50 mM  $KNO_3$  (—♦—) und mit 50 mM  $KNO_3$ , welches erst zum Zeitpunkt  $t = 3,16$  h (Pfeil) zugegeben wurde (—▲—). Die Daten vom Wildtyp PAO1 in LB-Medium mit Nitrat (—■—) wurden aus der Abb. 69 zum Vergleich übernommen. Die Kulturen enthielten 200 ml Medium und wurden luftdicht verschlossen.**

### 3.2.5 Einfluss der dissimilatorischen Nitratreduktasen von *P. aeruginosa* auf die Biofilmbildung

Hintergrund dieses Versuches war es, die Bedeutung der Nitratreduktasen NarGHIJ und NapABC von *P. aeruginosa* während der Biofilmbildung zu untersuchen.

Dies erfolgte, indem die hergestellten „Knockout“-Mutanten PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDEF, \Delta narGHIJ$ ) sowie der Wildtyp PAO1 auf ihre Biofilmbildung in Mikrotiterplatten und im Flow chamber System untersucht wurden. Da die Mutante der cytoplasmatischen Nitratreduktase ( $\Delta narGHIJ$ ) PANQ03 zu dem Zeitpunkt der Experimente in Dänemark noch nicht zur Verfügung stand, konnte diese bei folgenden Experimenten nicht berücksichtigt werden.

Weiterhin wurden die Aktivitäten der Promotoren beider Nitratreduktasen über *gfp*-Fusionen während der Biofilmbildung beobachtet. Das Hauptziel war die Lokalisierung von denitrifizierenden Zellen und Zellen, welche Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwenden. Da  $O_2$  die cytoplasmatische Nitratreduktase NarGHIJ inhibiert, sollte dieses Experiment Aufschluss über die Sauerstoffverhältnisse in den Biofilmstrukturen geben. Zusätzlich sollten durch die *gfp*-Fusion des *nap*-Promotors weitere Kenntnisse über die Funktion der periplasmatischen Nitratreduktase in *P. aeruginosa* gesammelt werden.

### 3.2.5.1 Das “Flow chamber” System für die Analyse von Biofilmen

Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus und der Funktionsweise des Systems befindet sich im Kapitel 2.15.1.

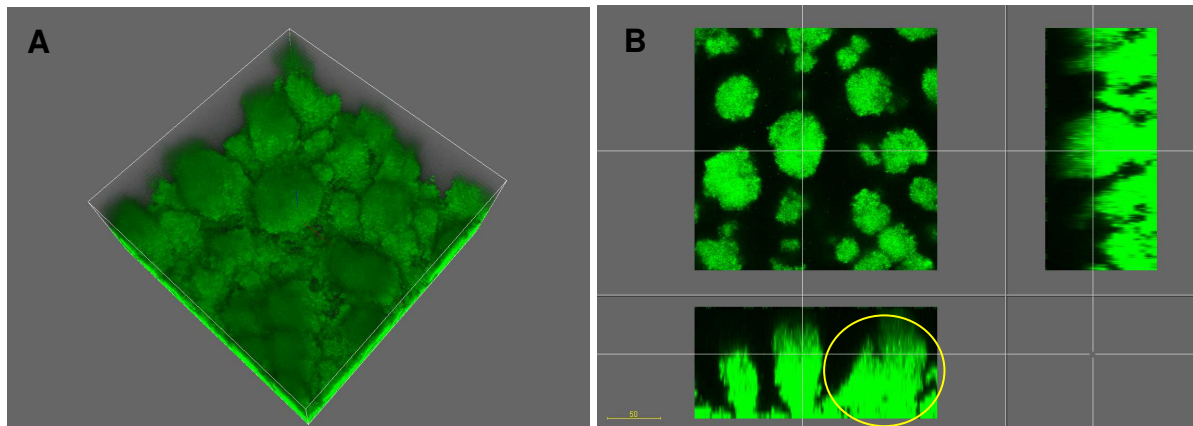
Damit die Stämme im konfokalen Laserscanning-Mikroskop beobachtet werden können, wurden diese vorher mit einem konstitutiv exprimierten *gfp*-Gen markiert. Dazu wurde das mini-Tn7 Transposon-System verwendet, welches das *gfp*-Gen ins Genom von *P. aeruginosa* integriert (s. Kap. 2.15.2.2). Durch das gebildete GFP können die lebenden Zellen zu jedem Zeitpunkt über ihre Fluoreszenz detektiert werden.

Die beiden Mutanten und der Wildtyp wurden in drei unabhängigen, identischen Biofilm-Setups getestet. In allen drei Ansätzen erfolgte von jedem Stamm eine Doppelbestimmung, wobei jeder Stamm mit und ohne Nitrat (50 mM KNO<sub>3</sub>) inkubiert wurde (12 Kammern pro Biofilm-Setup). Die Biofilmbildung erfolgte in AB-Medium mit 0,3 mM Glukose bei 37 °C. Nach drei und nach sechs Tagen wurden die Durchflusszellen unter dem Mikroskop betrachtet und ausgewertet.

Bei der Entstehung von Biofilmen unterscheidet man fünf verschiedene Phasen (Sauer *et al.*, 2002):

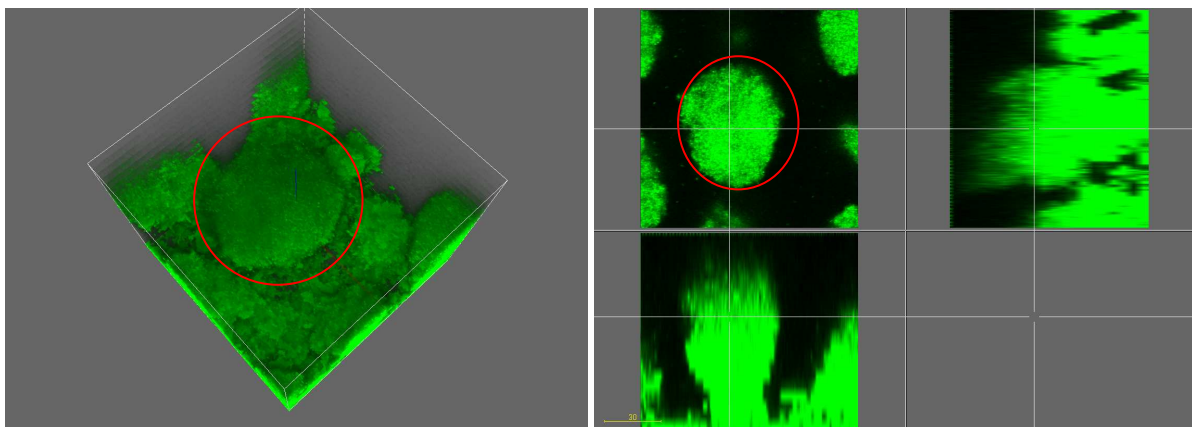
Nach der initialen Adhäsion (Phase I; „reversible attachment“), in welcher die planktonischen Zellen über schwache Bindungskräfte mit der Phasengrenze (Deckgläschen) in Kontakt treten, lagern diese sich mit anderen Zellen zusammen, um in der Phase II irreversibel an der Oberfläche zu binden und die so genannte Mikrokolonien zu bilden. Durch das Wachstum der Mikrokolonien nähern sich diese gegenseitig an (Phase III; „maturing I“) und wachsen schließlich übereinander (Phase IV; Maturing II). Im Laufe der Zeit entsteht somit eine mehrschichtige, komplexe, dreidimensionale Struktur.

In folgender Abbildung ist ein solcher, im Flow chamber System entstandener, Biofilm von *P. aeruginosa* Wildtyp dargestellt (Abb.71).



**Abb.71: Ausschnitt eines von *P. aeruginosa* PAO1 gebildeten Biofilms im „Flow chamber“ System (6. Tag).** Die Zellen sind durch GFP grün markiert. Bild A zeigt eine dreidimensionale Ansicht, in Bild B sind die Seitenansichten und die Aufsicht auf eine der oberen Schichten des Biofilms (Bild A) dargestellt. Das Zusammenwachsen zweier Mikrokolonien ist durch den gelben Kreis im Bild B gekennzeichnet.

Bei den Strukturen, welche in der Aufsicht als Kreis, in der Seitenansicht jedoch als pilzförmig zu erkennenden sind, handelt es sich um die so genannten Mikrokolonien. Eine von *P. aeruginosa* gebildete Mikrokolonie ist in folgender Abbildung nochmals detailliert dargestellt (Abb. 72).



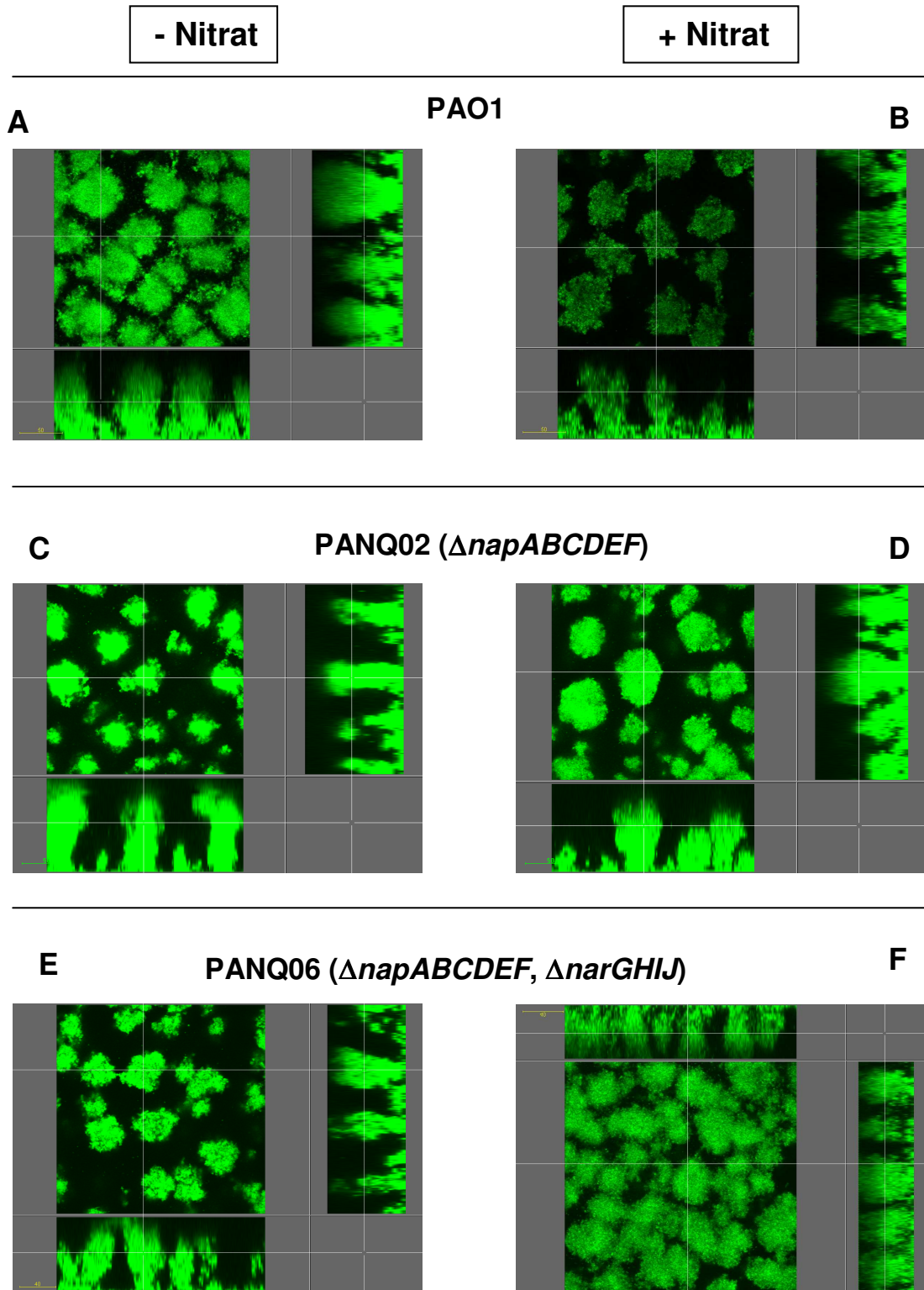
**Abb.72: Detaillierte Darstellung einer Mikrokolonie (roter Kreis) aus einem Ausschnitt eines von *P. aeruginosa* PAO1 gebildeten Biofilms im „Flow chamber“ System (6. Tag).** Die Zellen sind durch GFP grün markiert. Bild A zeigt eine dreidimensionale Ansicht, in Bild B sind die Seitenansichten und die Aufsicht auf eine der oberen Schichten des Biofilms (Bild A) dargestellt.

Auch das Zusammenwachsen einzelner Mikrokolonien konnte während der Untersuchungen aufgezeichnet werden (Abb. 71, Bild B, gelber Kreis). Aufgrund dieser Beobachtungen befindet sich der Biofilm in diesem System am sechsten Tag in seiner Reife-Phase (Phase III und IV), deren Ergebnis eine mehrschichtige, komplexe, dreidimensionale Biofilm-Struktur ergibt.

An diese Phase schließt sich die „dispersion“-Phase (Phase V) an. Diese ist dadurch charakterisiert, dass sich Biofilmzellen im Gleichgewicht zur Neubildung von Zellen aus dem Verband lösen. Dies geschieht entweder durch Erosion der Biofilmoberflächenzellen, durch Herausreißen ganzer Fetzen („sloughing“) oder durch aktive Bewegung der Bakterien, die aus dem Zellverband heraus schwimmen und Löcher hinterlassen (Sauer et al., 2002). Die heraus gelösten Zellen können an anderer Stelle einen neuen Biofilm bilden.

Bei den mikroskopischen Untersuchungen der Mutanten PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHJ$ ) konnten im Vergleich zum Wildtyp PAO1 keine signifikanten Unterschiede in der Biofilmbildung festgestellt werden (Abb.73). Unabhängig von der Nitratzugabe zeigten alle Ansätze die gleichen Strukturen wie der Wildtyp. In jeder Kammer bildeten sich die typischen pilzförmigen Mikrokolonien. In der Abbildung sichtbare Unterschiede in der Morphologie der Mikrokolonien (Länge, Breite) und Zelldichte sind nicht signifikant, da sie auch innerhalb eines Stammes bei gleichen Bedingungen auftreten können.

In der Abb. 73 wurde von jedem untersuchten Stamm und jeder Bedingung eine repräsentative Aufnahme dargestellt.



**Abb.73: Ausschnitte von *P. aeruginosa* (PAO1)-Biofilmen aus dem „Flow chamber“ System (6. Tag).** Die Bilder A-F zeigen die Seitenansichten und die Aufsicht auf eine der oberen Schichten des jeweiligen Biofilms (Bilder A und B: Wildtyp PAO1; Bilder C und D: PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ); Bilder E und F: PANQ06 ( $\Delta napABCDEF, \Delta narGHIJ$ )). Die Zellen sind durch GFP grün markiert. Alle drei Stämme wurden mit und ohne 50 mM  $KNO_3$  inkubiert.

Aufgrund der Tatsache, dass Nitrat keinen Einfluss auf die Biofilmbildung hat und die Doppelmutante PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) in jeder Kammer einen Biofilm bildete, liegt die Vermutung nahe, dass die Bedingungen im „Flow chamber“ System ausschließlich aerob sind und *P. aeruginosa* Sauerstoff anstatt Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet. In diesem Falle wäre das System für die notwendigen Untersuchungen nicht geeignet.

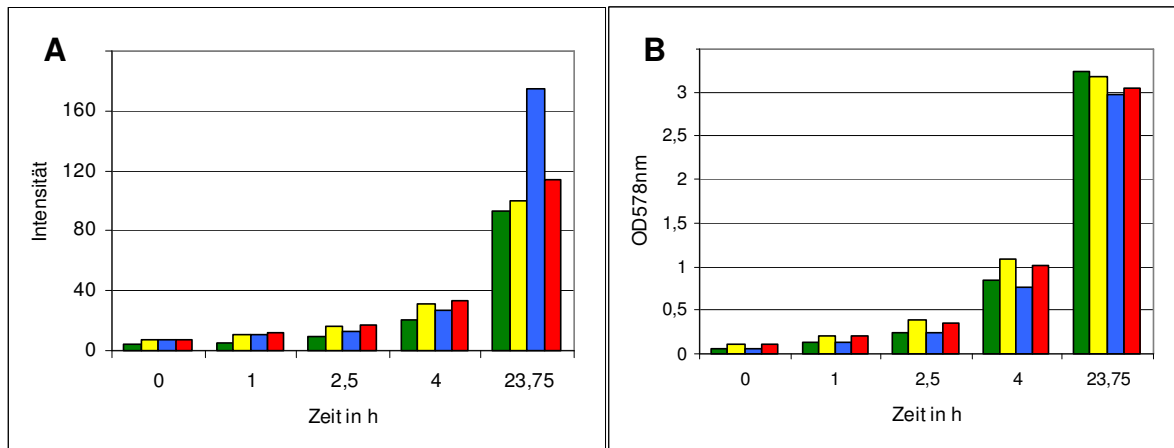
Darüber, in wie weit die einzelnen Nitratreduktasen während der Biofilmbildung aktiv sind und ob es im Biofilm anaerobe Bereiche gibt, sollten die folgenden Untersuchungen der Promotoraktivitäten Aufschluss geben.

### **3.2.5.2 Test der hergestellten *gfp*-Fusionen des *napE*- und *narK*- Promotors unter aeroben und anaeroben Bedingungen in einer Schüttelkultur**

Um die Aktivität der Promotoren der beiden Nitratreduktasen NarGHIJ und NapABC während der Biofilmbildung unter dem Mikroskop beobachten zu können, erfolgte eine Fusion der Promotoren mit dem *gfp*-Gen (siehe Kap. 2.13.1). Die konstruierten Stämme mit den integrierten *gfp*-Fusionen wurden im Falle des *napE*-Promotors mit PANQ07 und im Falle des *narK*-Promotors mit PANQ08 bezeichnet.

Zuerst erfolgte die Untersuchung der beiden Stämme unter aeroben Bedingungen in AB-Medium mit Glukose in einer Schüttelkultur. Dazu wurden die Stämme über Nacht aerob gezüchtet und am nächsten Tag davon eine neue aerobe Kulturen angelegt. Von diesen wurden dann in bestimmten Abständen die OD<sub>578nm</sub> und das gebildete GFP gemessen (s. Kap. 2.13.2). Zum Vergleich dienten der Wildtyp ohne GFP und der Wildtyp mit dem Leervektor pMH305. Dieser Vektor enthält das für die Fusionen verwendete *gfp*-Gen, jedoch ohne fusionierten Promotor. In folgenden Diagrammen sind die gemessenen Intensitäten der Fluoreszenz und die OD<sub>578nm</sub> der Kultur zum Zeitpunkt der Messung graphisch dargestellt.





**Abb.74: Gemessene Fluoreszenz-Intensitäten (A) und die zum Zeitpunkt der Messung bestehende Zelldichte (B) von aeroben *P. aeruginosa*-Kulturen (■ Wildtyp PAO1; ■ PAO1 + pMH305 Leervektor; ■ PANQ07 (*napE<sub>P</sub>-gfp*) und ■ PANQ08 (*nark<sub>P</sub>-gfp*)) in AB-Medium mit Glukose und Nitrat.**

Die Ergebnisse zeigen, dass mit zunehmender Zellzahl der Kulturen, mehr GFP gebildet wird und somit die Fluoreszenz der Kulturen, in Abhängigkeit von der Zelldichte, ansteigt.

Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenz zwischen PANQ08 (*nark<sub>P</sub>-gfp*), dem Wildtyp PAO1 und dem PAO1 mit dem Leervektor pMH305 verzeichnet werden.

Der Wildtyp-Stamm PAO1 enthält kein Gen, welches die Information für die Bildung von GFP enthält. Demnach handelt es sich bei den gemessenen Intensitäten um die Eigenfluoreszenz von *P. aeruginosa*. Das bedeutet, dass die ermittelten Intensitäten von PANQ08 und dem Wildtyp PAO1 mit dem Leervektor pMH305 ebenfalls nicht durch gebildetes GFP, sondern durch die Eigenfluoreszenz bedingt sind.

Durch diese Messung konnte bestätigt werden, dass das im Leervektor pMH305 vorhandene *gfp*-Gen ohne fusionierten Promotor nicht exprimiert wird.

Die Ergebnisse verdeutlichen ebenfalls, dass der Promotor der cytoplasmatischen Nitratreduktase NarGHIJ unter den getesteten Bedingungen nicht aktiv ist. Das entspricht auch den Erwartungen, da die Nitratreduktase in Gegenwart von Sauerstoff nicht benötigt wird und das beteiligte Fe-S-Zentrum sauerstoffempfindlich ist. Untersuchungen des gleichen Promotors mittels *lacZ*-Reportergernefusion zeigten ebenfalls keine signifikante Transkription des *P. aeruginosa* *nark<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHIJ*-Operons unter aeroben Bedingungen (Krieger, 2001).

Anders ist es bei der *gfp*-Fusion mit dem Promotor von *napE* (PANQ07). Obwohl die Zelldichten aller vier Kulturen zum Zeitpunkt der Fluoreszenz-Messung annähernd gleich sind, zeigt die PANQ07-Kultur nach 23,75 h eine deutlich höhere Intensität (174,8) als

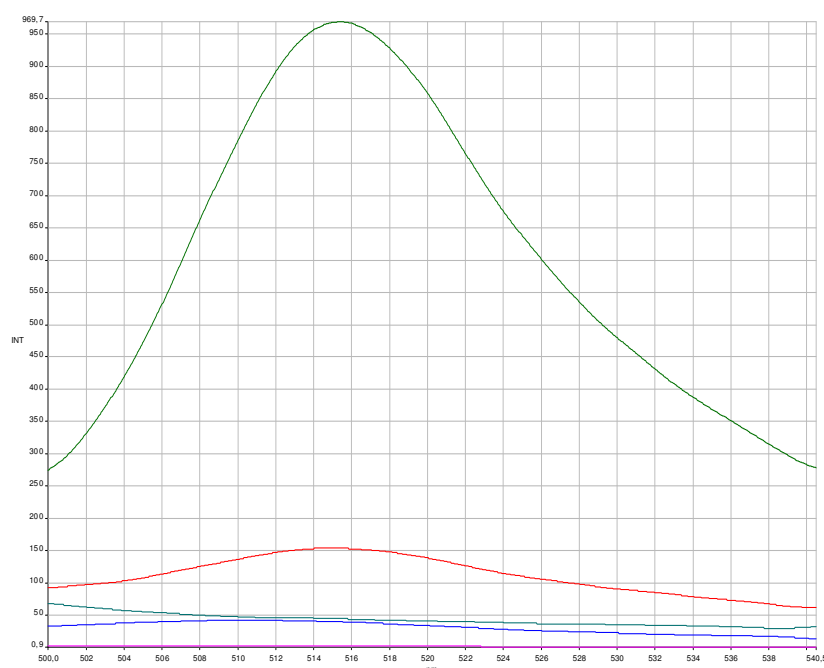
der Wildtyp PAO1 (93,4), der Wildtyp mit dem Leervektor pMH305 (100,73) und PANQ08 (113,7). Das besagt, dass der Promotor der periplasmatischen Nitratreduktase NapABC unter aeroben Bedingungen mit Nitrat in der Stationär-Phase induziert wird.

Um die Funktion der *narK<sub>P</sub>-gfp*-Fusion und die Aktivität der NarGHIJ-Nitratreduktase zu überprüfen wurde das Experiment wiederholt, jedoch erfolgte die Zellzüchtung im anaeroben Milieu. Da die Reifung von GFP Sauerstoff benötigt, ändert sich unter diesen Bedingungen das Messverfahren. Vor der Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität erfolgt ein aerober Inkubationsschritt, während dessen durch Zugabe von Antibiotika das Zellwachstum inhibiert wurde (siehe Kap. 2.13.2).

Nach 20,25 h erreichten die getesteten Stämme folgende Zelldichten (Tab.34) und anschließende Abbildung zeigt die aufgenommenen Fluoreszenzspektren der Kulturen.

**Tab. 34: Zum Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung ermittelte Optische Dichten (OD<sub>578nm</sub>) der vermessenen Kulturen PAO1, PAO1 mit pMH305, PANQ07 und PANQ08 und deren Intensität unter anaeroben Bedingungen.**

| Stamm                              | OD 578nm | Intensität 515nm |
|------------------------------------|----------|------------------|
| PAO1                               | 1,59     | 44,6             |
| PAO1 + pMH305                      | 1,71     | 39,3             |
| PANQ07 <i>napE<sub>P</sub>-gfp</i> | 1,88     | 153,9            |
| PANQ08 <i>narK<sub>P</sub>-gfp</i> | 1,38     | 968,8            |



**Abb.75: Fluoreszenzspektren von anaeroben *P. aeruginosa*-Kulturen (Wildtyp PAO1, PAO1 + pMH305, PANQ07 *napE<sub>P</sub>-gfp*, PANQ08 *narK<sub>P</sub>-gfp*) und unbeimpften Kultur-Medium (AB-Medium mit Glukose und Nitrat).**

Die Fluoreszenzspektren (Abb.75) und die daraus ermittelten Intensitäten (Tab. 34) zeigen, dass die Promotoren beider Nitratreduktasen in der Stationärphase unter denitrifizierenden Bedingungen aktiv sind.

Die gemessene Intensität des Stammes PANQ07 (*napE<sub>P</sub>-gfp*) unter stationären anaeroben Bedingungen betrug 153,9 (Tab.34) und ist damit deutlich höher als die ermittelte Eigenfluoreszenz von *P. aeruginosa* (44,6). In der Stationärphase der aeroben Kultur konnte vom gleichen Stamm eine Fluoreszenzintensität von 174,8 gemessen werden (Abb.74). Da sich beide Werte nur geringfügig voneinander unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass eine Induktion des *napE*-Promotors unabhängig vom Nitrat in der Stationärphase erfolgt.

Die Fluoreszenz-Intensität des Wildtyps unterscheidet sich auch hier kaum von der des Wildtyps mit dem Leervektor pMH305.

Im Gegensatz zu den Messungen im aeroben Milieu konnte unter denitrifizierenden Bedingungen eine deutliche Induktion des Promotors der cytoplasmatischen Nitratreduktase NarGHIJ verzeichnet werden. Die Intensität der Fluoreszenz betrug 968,8. Bedingt durch die Sauerstoffempfindlichkeit dieser Reduktase kam es unter aeroben Bedingungen vermutlich zu keiner Aktivierung des Promotors (Abb.75).

Die Ergebnisse zeigten, dass der Promotor der periplasmatischen Nitratreduktase NapABC sowohl unter anaeroben, als auch unter aeroben Bedingungen in der Stationärphase aktiv ist. Die zu verzeichnende stark erhöhte Aktivität des *narK*-Promotors unter anaeroben Bedingungen stimmt mit den von Krieger (2001) durchgeführten *lacZ*-Reporterfusion-Studien des gleichen Promotors überein.

Da beide fusionierten Promotoren eine Induktion zeigten, wurden sie zur Konstruktion von Integrationsvektoren (pNQ05 und pNQ06) eingesetzt (siehe Kap. 2.13.1).

### **3.2.5.3 Promotoraktivitäten der Gene für die Nitratreduktasen NarGHIJ und NapABC während der Biofilmbildung**

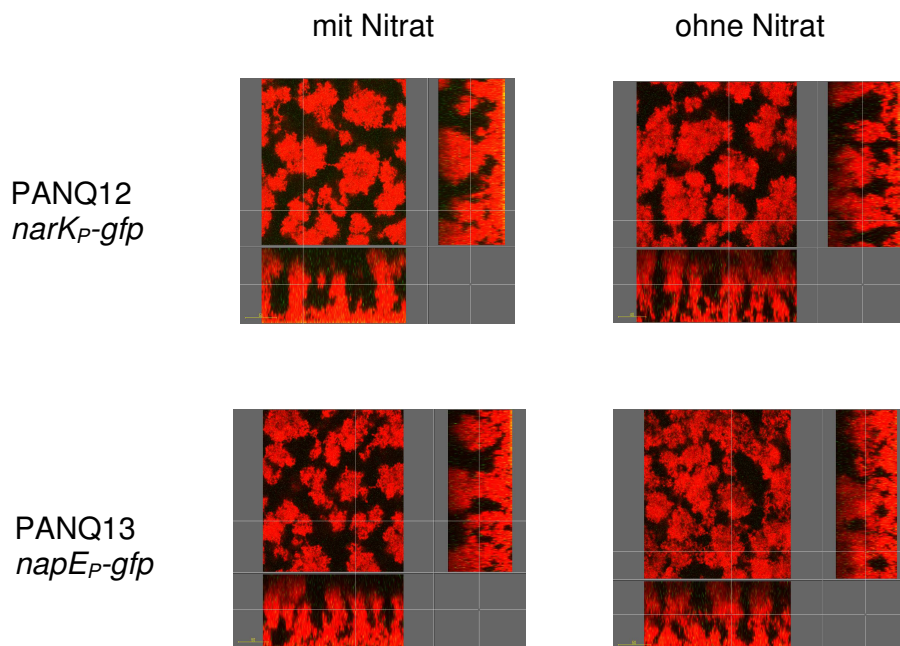
Nach der Integration der Vektoren pNQ05 und pNQ06 in das Genom von *P. aeruginosa* wurden die Antibiotika-Resistenzkassette und große Teile des Vektors mittels Flp-Rekombinasebehandlung wieder entfernt. Die Aktivitäten der integrierten, fusionierten Promotoren in den entstandenen Stämmen PANQ12 (*napE<sub>P</sub>-gfp*) und PANQ13 (*narK<sub>P</sub>-gfp*) wurden anschließend während der Biofilmbildung im „Flow chamber“ System untersucht. Von besonderem Interesse war hier, in welchen Regionen der Biofilmstrukturen die Reduktasen, abhängig vom Sauerstoff, gebildet werden.

Als Medium wurde das Minimalmedium AB mit 300  $\mu$ M Glukose verwendet. Beide Stämme wurden in drei gleichen, unabhängigen Biofilmsätzen getestet. In jedem Ansatz erfolgte eine Doppelbestimmung, d.h., dass pro Biofilmsatz zwei Kanäle der insgesamt vier Durchflusszellen (12 Kanäle) mit dem gleichen Stamm beimpft und unter identischen Bedingungen inkubiert wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass in einer Durchflusszelle der gleiche Stamm nicht zwei Mal vorkommt. Weiterhin wurde jeder Stamm in AB-Medium mit 50 mM Nitrat und ohne Nitrat getestet.

Die Inkubationsdauer der Bakterien im Biofilmsystem betrug sechs Tage. Anschließend wurden sie mit SYTO 62 (s. Kapitel 2.15.2.1) gefärbt und mittels konvokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht.

Alle Zellen des Biofilms fluoreszierten durch die Färbung mit SYTO 62 (Rhodamin) rot. Die Zellen, welche durch den aktiven Promotor GFP bildeten, würden grün fluoreszieren. Im Mikroskop zeigen dann die Zellen mit aktiven Promotor, durch die Überlappung beider Farben, eine Gelbfärbung.

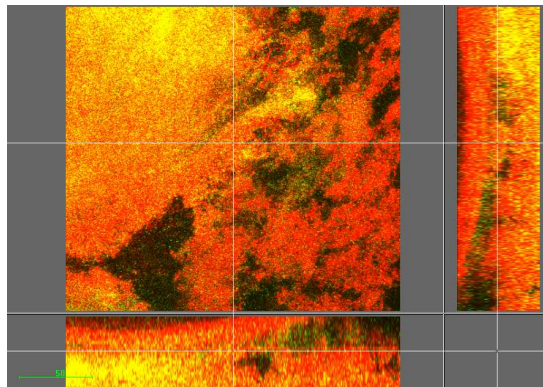
Alle drei untersuchten Biofilmsätze zeigten das gleiche Ergebnis. In folgender Abbildung sind vier repräsentative Bilder dargestellt.



**Abb.76: Auf- und Seitenansicht von *P. aeruginosa* PAO1 gebildeten Biofilmen im Flow chamber System.** Alle Zellen des Biofilms fluoreszierten durch die Färbung mit SYTO 62 (Rhodamin) rot. Die Zellen, welche durch einen aktiven Promotor GFP bildeten würden grün fluoreszieren, wodurch die Zellen mit aktiven Promotor, durch die Überlappung beider Farben, eine Gelbfärbung zeigen sollten. Die mit *gfp* fusionierten Promotoren beider Nitratreduktasen NapABC (*napE<sub>P</sub>-gfp*) und NarGHIJ (*nark<sub>P</sub>-gfp*) wurden auf ihre Aktivität in Abhängigkeit von Nitrat getestet.

Bei den Untersuchungen wurde deutlich, dass es in keinem gebildeten Biofilm zu einer deutlichen Gelbfärbung kam (Abb.76). Das bedeutet, dass keiner der getesteten Promotoren unter diesen Bedingungen aktiv ist und deshalb kein Nitrat umgesetzt wird. Demnach nutzt *P. aeruginosa* in diesem System Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Einzig der *narK*-Promotor zeigte in Anwesenheit von Nitrat eine schwache gelbliche Färbung am Boden des Biofilms (Abb.76). Am Boden ist die Zelldichte am höchsten und somit wird der Sauerstoff schnell verbraucht, so dass sich dann ein anoxygenes Milieu einstellen kann. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die im „Flow chamber“ System gebildeten Biofilmstrukturen nicht die nötige Zelldichte erreichen, um in den Mikrokolonien Sauerstoff-limitierende Bedingungen zu erzeugen.

Das durch die aerobe Atmung entstandene Gas zerstörte teilweise die Biofilmstrukturen, indem die Gasblasen die Zellen zusammen schoben und sich somit dicke Zellaggregate bildeten. Bei der mikroskopischen Betrachtung einer solchen Kammer zeigte sich eine starke Gelbfärbung der Zellen (Abb.77).



**Abb.77: Auf- und Seitenansicht von einer Ansammlung von *P. aeruginosa* PAO1 Zellen in einem zerstörten Biofilm im „Flow chamber“ System.** Alle Zellen fluoreszierten durch die Färbung mit SYTO 62 (Rhodamin) rot. Die Zellen, welche durch einen aktiven Promotor GFP bildeten, fluoreszierten grün. Auf den Aufnahmen zeigen die Zellen mit aktiven Promotor, durch die Überlappung beider Farben, eine Gelbfärbung. Der mit *gfp* fusionierte Promotor der Gene der Nitratreduktase NarGHIJ (*narK<sub>P</sub>-gfp*) wurde auf seine Aktivität in Abhängigkeit von Sauerstoff getestet.

Hierbei handelt es sich um den Stamm PANQ13 (*narK<sub>P</sub>-gfp*). In der Abb. 77 ist deutlich zu erkennen, dass in den inneren Regionen der Zellansammlung der Promotor der cytoplasmatischen Nitratreduktase sehr aktiv ist.

Da die Fluoreszenzmessungen der *gfp*-Fusionen in der Schüttelkultur zeigten, dass der *narK*-Promotor, im Gegensatz zu anaeroben Bedingungen, unter aeroben Bedingungen

nicht aktiv (Abb. 74) ist, kann aus der Verteilung der Färbung geschlossen werden, dass im Inneren der Zellansammlung anaerobe Bedingungen vorherrschen.

Mit dieser Beobachtung konnte gezeigt werden, dass die Aktivitäten der mit *gfp* fusionierten Promotoren im Mikroskop verfolgt werden können. Weiterhin bestätigt es die Vermutung, dass die Biofilmbildung im „Flow chamber“ System unter aeroben Bedingungen stattfindet und sich auch im Inneren der Mikrokolonien noch kein anoxigenes Milieu einstellt hat. Das *P. aeruginosa* Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzt, erklärt auch, warum Nitrat keinen Einfluss auf die Aktivität der Promotoren in diesem System hat.

Die nicht vorhandenen anaeroben Bedingungen im Biofilmsystem erklären ebenfalls, dass die auf Biofilmbildung getesteten Mutanten PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDEF, \Delta narGHIJ$ ) keinen Unterschied zum Wildtyp zeigten (s. Kap. 3.2.5.1). Die Bedingungen im Flow chamber System können die von Worlitzsch et al. (2002) beschriebene Sauerstofflimitierung in den Biofilmen in der Lunge nicht simulieren. Das System ist so nicht geeignet, das Verhalten der Mutanten unter den von Worlitzsch et al. (2002) postulierten Bedingungen zu untersuchen.

### 3.2.5.4 Mikrotiterplatten-Assay

Wie in Kapitel 2.15.3 wurden die Stämme PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ), PANQ06 ( $\Delta napABCDEF, \Delta narGHIJ$ ) und der Wildtyp PAO1 auf ihre Biofilmbildung in Mikrotiterplatten untersucht. Mit dieser Methode konnten die Stämme erstmals unter anaeroben Bedingungen untersucht werden.

Da die Mutante der cytoplasmatischen Nitratreduktase ( $\Delta narGHIJ$ ) PANQ03 zu dem Zeitpunkt der Experimente in Dänemark noch nicht zur Verfügung stand, konnte diese bei folgendem Experiment ebenfalls nicht berücksichtigt werden.

Als Medium wurde das Minimalmedium AB mit Glukose (ABG) verwendet.

|                                   |        |                   |         |
|-----------------------------------|--------|-------------------|---------|
| Folgende Ansätze wurden getestet: | 1. ABG | mit 50 mM Nitrat; | aerob   |
|                                   | 2. ABG | ohne Nitrat;      | aerob   |
|                                   | 3. ABG | mit 50 mM Nitrat; | anaerob |
|                                   | 4. ABG | ohne Nitrat;      | anaerob |

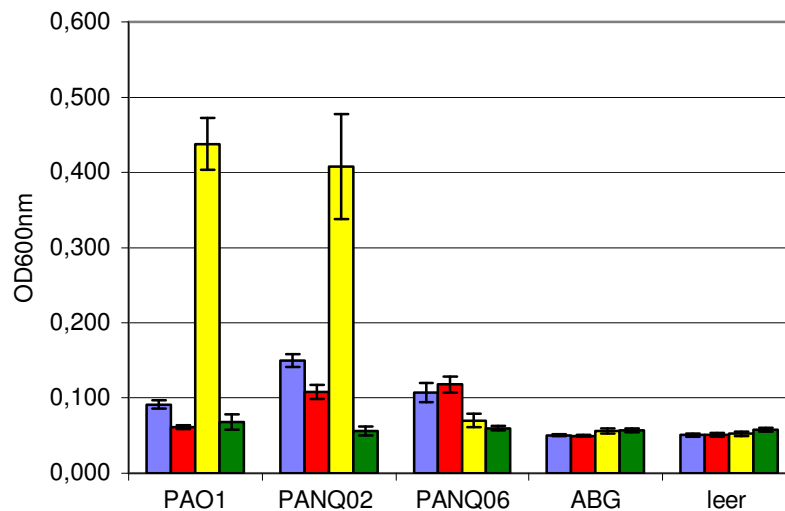
Es wurden zwei Mikrotiterplatten nach dem gleichen Muster beimpft. In den ersten drei Spalten der jeweiligen Platte wurden in acht Parallelen die zu testenden Stämme PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ), PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) und der Wildtyp PAO1 aufgetragen, dann wurden drei Spalten mit Medium (ABG) gefüllt und drei blieben leer. Insgesamt wurden 9 Spalten gefüllt.

Eine der Mikrotiterplatten wurde aerob bei 37 °C inkubiert, die andere anaerob. Der nach dem Färben der anhaftenden Zellen wieder gelöste Farbstoff Kristall-Violett wurde im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer OD von 600 nm vermessen. Kristall-Violett bindet als positiv geladener Farbstoff an die im Allgemeinen negativ geladene Zellwand (Madigan et al., 2003).

Von den Daten einer Spalte, das heißt, von den Werten der acht Parallelen eines Stammes pro Platte (Ansatz), wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt. Für die Auswertung der Daten des Mediums (ABG) und der leeren „Wells“ wurde der Mittelwert aus allen 24 „Wells“ (drei Spalten und acht Reihen) errechnet. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen und einem Diagramm zusammengefasst.

**Tab.35: Biofilmbildung von *P. aeruginosa* in Mikrotiterplatten.** Ergebnisse (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen) des Mikrotiterplatten-Tests der drei getesteten Stämme PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ), PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) und des Wildtyps PAO1 unter vier verschiedenen Bedingungen. Der nach dem Färben der anhaftenden Zellen wieder gelöste Farbstoff Kristall-Violett wurde im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer OD von 600 nm vermessen. ABG: AB-Medium mit Glukose; leer: nicht gefüllte „Wells“. Hohe Werte bedeuten, dass viele Zellen anhafteten und somit viel Biofilm gebildet wurde und geringe Werte zeigen wenig Biofilmbildung an.

|                     | PAO1              | PANQ02<br>( $\Delta napABCDEF$ ) | PANQ06<br>( $\Delta napABCDEF$ ,<br>$\Delta narGHIJ$ ) | ABG               | leer              |
|---------------------|-------------------|----------------------------------|--|-------------------|-------------------|
| aerob mit Nitrat    | 0,091 $\pm$ 0,006 | 0,150 $\pm$ 0,009                | 0,107 $\pm$ 0,013                                      | 0,051 $\pm$ 0,001 | 0,051 $\pm$ 0,002 |
| aerob ohne Nitrat   | 0,062 $\pm$ 0,003 | 0,108 $\pm$ 0,01                 | 0,118 $\pm$ 0,011                                      | 0,050 $\pm$ 0,001 | 0,051 $\pm$ 0,002 |
| Anaerob mit Nitrat  | 0,438 $\pm$ 0,034 | 0,408 $\pm$ 0,07                 | 0,070 $\pm$ 0,009                                      | 0,056 $\pm$ 0,004 | 0,052 $\pm$ 0,003 |
| anaerob ohne Nitrat | 0,068 $\pm$ 0,01  | 0,056 $\pm$ 0,006                | 0,060 $\pm$ 0,003                                      | 0,057 $\pm$ 0,003 | 0,058 $\pm$ 0,003 |



**Abb.78: Biofilmbildung von *P. aeruginosa* in Mikrotiterplatten.** Graphische Darstellung der Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) des Mikrotiterplatten-Tests der drei getesteten Stämme PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ), PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) und des Wildtyps PAO1 unter vier verschiedenen Bedingungen: ■ aerob mit Nitrat, ■ aerob ohne Nitrat, ■ anaerob mit Nitrat und ■ anaerob ohne Nitrat. Der nach dem Färben der anhaftenden Zellen wieder gelöste Farbstoff Kristall-Violett wurde im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer OD von 600 nm vermessen. Hohe Werte bedeuten, dass viele Zellen anhafteten und somit viel Biofilm gebildet wurde und geringe Werte zeigen wenig Biofilmbildung an.

Die Ergebnisse (Tab. 35, Abb.78) zeigen, dass unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor (gelbe Balken) deutlich mehr *P. aeruginosa* Wildtyp-Zellen im „Well“ haften bleiben, als unter aeroben Bedingungen mit und ohne Nitrat (blaue und rote Balken). Daraus kann geschlossen werden, dass *P. aeruginosa* (PAO1) für die Biofilmbildung denitrifizierende Bedingungen bevorzugt.

Durch die funktionierende cytoplasmatische Nitratreduktase NarGHIJ im Stamm PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) sind zwischen dieser Mutante und dem Wildtyp PAO1 hinsichtlich der Biofilmbildung keine Unterschiede zu verzeichnen.

Ohne Nitratreduktasen kann die Doppelmutante PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) unter denitrifizierenden Bedingungen nicht wachsen und somit zeigen die Ergebnisse der Kristall-Violett-Färbung der Mutante keinen Unterschied zu den Kontrollwerten (ABG und leere Wells).

Da unter aeroben Bedingungen *P. aeruginosa* Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzt ist Nitrat für das Wachstum nicht essentiell. Jedoch ist zu erkennen, dass Nitrat einen stimulierenden Einfluss auf die Biofilmbildung ausübt. Sowohl bei der *nap*-Mutante (PANQ02) als auch beim Wildtyp sind die Werte ( $OD_{600nm}$ ) mit Nitrat (0,150, bzw. 0,091)



höher als ohne Nitrat (0,108, bzw. 0,062). Außer bei der Doppelmutante PANQ06, welche keine Nitratreduktasen mehr enthält. Hier unterscheiden sich die beiden Werte nur geringfügig (mit NO<sub>3</sub>: 0,107 und ohne NO<sub>3</sub>: 0,118). Bedingt durch die Tatsache, dass die cytoplasmatische Nitratreduktase NarGHIJ durch Sauerstoff inhibiert wird, und der Stamm ohne periplasmatische Nitratreduktase NapABC (PANQ02) ebenfalls unter aeroben Bedingungen mit Nitrat eine erhöht Biofilmbildung zeigt, als ohne Nitrat, liegt die Vermutung nahe, dass der stimulierende Effekt von Nitrat auf die Biofilmbildung unter aeroben Bedingungen nicht im Zusammenhang mit den Nitratreduktasen NarGHIJ und NapABC steht.

Da ohne Nitrat *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen kein alternativer Elektronenakzeptor zur Verfügung steht, ist kein Wachstum und somit keine Biofilmbildung in den anaeroben Wells ohne Nitrat zu verzeichnen (grüne Balken). Das trifft ebenfalls für die Mutanten PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) zu.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Zusammenfassungen

Der anaerobe Energiestoffwechsel ist eine wichtige Komponente für das Überleben in Biofilmen und für die Infektion durch das opportunistisch pathogene Bakterium *P. aeruginosa*. Nach der erfolgreichen Etablierung einer Proteomanalytik konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Proteinen während des anaeroben Wachstums mit Nitrat (Denitrifikation) im Vergleich zu aeroben Bedingungen unterschiedlich synthetisiert und zugehörige Gene entsprechend differentiell reguliert werden.

Zu denen unter anaeroben Bedingungen signifikant stärker gebildeten Proteinen gehören in erster Linie die Proteine der Denitrifikation selbst, Nitratreduktase (NarH) und Nitritreduktase (NirS), der Regulator NirQ und Proteine, die an der Synthese der Kofaktoren (Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid, Häm-Gruppen) und am Elektronentransport beteiligt sind. Weiterhin sind Proteine der Eisenspeicherung und deren Regulation anaerob in erhöhten Mengen nachweisbar.

Bei der Proteomuntersuchung einer Mutante der Gene des Nitratsensorsystems (NarXL) konnte gezeigt werden, dass die Synthese der Nitratreduktase NarGHJI deutlich vermindert und stattdessen die Proteine der Argininfermentation (ArcABC) durch dieses System stark induziert werden. Ebenfalls beeinflusst NarL die Transkription drei weiterer Gene, *oprE*, PA5496 und PA5497.

Die Proteomanalysen von Mutanten der Regulatoren Dnr und Anr konnten zeigen, dass die Regulation der in die Denitrifikation involvierten Gene *nirS*, *nirQ*, *hemF* und die Gene der Nitratreduktase (*narGHJI*), über die Anr-Dnr-Kaskade erfolgt. Die durch bioinformatische Analysen bestimmte Anr-Bindestelle im Promotorbereich dieser Gene konnte somit funktionell bestätigt werden.

Auch die in den Promotorbereichen von *katA* (Katalase), *modA* (Molybdat - Bindeprotein) und PA5496 (hypothetisches Protein) vorhergesagten Anr-Bindestelle werden durch die Proteomanalysen bestätigt. Diese offenbarten eine direkte Abhängigkeit der Transkription der entsprechenden Gene durch Anr (*katA*) und Dnr (*modA* und PA5496).

Die durchgeführten Untersuchungen der beiden dissimilatorischen Nitratreduktasen NarGHJI und NapABC von *P. aeruginosa* zeigten, dass die periplasmatische Nitratreduktase NapABC während des Wachstums in einer Batch-Kultur keine essentielle Rolle für die Denitrifikation spielt und die eigentliche Nitratreduktase NarGHJI nicht ersetzt werden kann. Durch Reporterfusionen mit *gfp* wurde deutlich, dass die Gene

*napABCDEF* konstitutiv, sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen, im geringen Maße exprimiert werden.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* im Vergleich zu aeroben Bedingungen für die Biofilmbildung ein anaerobes Milieu mit Nitrat als Elektronenakzeptor bevorzugt.

Die gewonnenen Daten tragen zum besseren Verständnis des für die Infektion und Biofilmbildung bedeutenden anaeroben Stoffwechsels und seiner Regulation bei.

### 4.2 Ausblicke

In weitergehenden Untersuchungen wäre es darüber hinaus von hohem Interesse, die bisher unbekannten und bei den Analysen der Regulatormutanten (Anr, Dnr und NarL) unterschiedlich gebildeten Proteine (PA5496/97, PA1677 und PA3326) im Einzelnen funktionell zu untersuchen.

Die erstmals gezeigten Abhängigkeiten der Proteine OprE, PA5496 und PA5497 von dem Nitratsensorsystem NarXL sollten ebenfalls auf Gen-Ebene (Promotoranalysen) nachgewiesen und die Regulationsmodelle weiter vervollständigt werden.

Ebenso bedarf das Regulationsschema von NirB weiterer Aufklärung. Sowohl bei den durchgeführten Proteomanalysen als auch bei dem Vergleich von theoretischen und praktischen pI- und Mr-Werten konnten nicht alle Widersprüche beseitigt werden.

Die Charakterisierung der Nitratreduktase-Mutanten PANQ05 ( $\Delta narGHIJ$ ), PANQ02 ( $\Delta napABCDEF$ ) und PANQ06 ( $\Delta napABCDEF$ ,  $\Delta narGHIJ$ ) in Chemostatkulturen mit konstanten und geringen Mengen an Nitrat (ca. 200  $\mu$ M) könnten zur Aufklärung der bisher noch unbekannten Funktion der periplasmatischen Nitratreduktase NapABC in *P. aeruginosa* führen. Ebenso die Untersuchung der Mutanten in einem anaeroben „Flow chamber“-Biofilmsystem.

## 5. Literatur und Internet - Adressen

### 5.1 Literatur

Arai, H., Igarashi, Y., Kodama, T. (1991) Anaerobically induced expression of the nitrite reductase cytochrome c-551 operon from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett 280:351-353.

Arai, H., Igarashi, Y. und Kodama, T. (1994) Structure and ANR-dependent transcription of the *nir* genes for denitrification from *Pseudomonas aeruginosa*. Biosci Biotech Biochem 58 (7): 1286 – 1291.

Arai, H., Igarashi, Y. und Kodama, T. (1995) Expression of *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. FEBS Lett 371:73-76.

Arai, H., Kodama, T., Igarashi, Y. (1997) Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 25:1141-1148.

Arai, H., Kodama, T., Igarashi, Y. (1999) Effect of nitrogen oxides on expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 170:19-24.

Arai, H., Mizutani, M. und Igarashi, Y. (2003) Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol 149: 29 – 36.

Bao, Y., Lies, D.P., Fu, H. und Roberts, G.P. (1991) An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of Gram-negative bacteria. Gene 109: 167-168.

Becher A., Schweizer, H. P. (2000) Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. BioTechniques 29 (5): 948 - 954.

- Bedzyk, L., Wang, T. und Ye, R.W. (1999) The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. J Bacteriol 181: 2802 - 2806.
- Bell, L.C., Richardson, D.J. und Ferguson, S.J. (1990) Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*: the periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. FEBS Lett 265: 85 - 87.
- Berggren, K.N., Schulenberg, B., Lopez, M.F., Steinberg, T.H., Bogdanova, A., Smejkal, G., Wang, A. und Patton, W.F. (2002) An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: Comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. Proteomics 2: 486 - 498.
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R. und Postel, W. (1982) Isoelectric focusing in immobilised pH gradients: principle, methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods 6 (4): 317 – 339.
- Bjorn, M.J., Iglewski, B.H., Ives, S.K., Sadoff, J.C. und Vasil, M.L. (1978) Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA-103. Infect Immun 19: 785 – 791.
- Blasco, F., Dos Santos, J.P., Magalon, A., Frixon, C., Guigliarelli, B., Santini, C.L. und Giordano, G. (1998) NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 28: 435 - 47.
- Blomberg, A., Blomberg, L., Fey, S.J., Mose Larsen, P., Roepstorff, P., Degand, P., Boutry, M., Posch, A. und Görg, A. (1995) Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis 16: 1935 – 1945.
- Boucher, J.C., Schurr, M.J., Yu, H., Rowen, D.W. und Deretic, V. (1997) *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: role of *mucC* in the regulation of alginate production and stress sensitivity. Microbiol 143: 3473 – 3480.
- Breckau, D., Mahlitz, E., Sauerwald, A., Layer, G. und Jahn, D. (2003) Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF) from *Escherichia coli* is stimulated by manganese. J Biol Chem 278 (47): 46625 - 46631.

- Brown, K., Tegoni, M., Prudencio, M., Pereira, A.S., Besson, S., Moura, J.J., Moura, I. und Cambillau, C. (2000) A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nat Struct Biol* 7: 191 – 195.
- Büttner, K., Bernhardt, J., Scharf, C., Schmid, R., Mäder, U., Eymann, C., Antelmann, H., Völker, A., Völker, U., Hecker, M. (2001) A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* 22: 2908 - 2935.
- CanTERS, G.W. (1996) The Azurin gene from *Pseudomonas aeruginosa* codes for a pre-protein with a signal peptide. *FEBS Lett* 212: 168 – 172.
- Cedar, H. und Schwartz, J.H. (1967) Localisation of the two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 242: 3753 – 3755.
- Christensen, B.B., Sternberg, C., Andersen, J.B., Palmer, R.J., Nielsen, A.T., Givskov, M. und Molin, S. (1999) Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods Enzymol* 310: 20 - 42.
- Clark, D.J. und Maaløe, O. (1967) DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 23: 99 – 112.
- Cooper, M., Tavankar, G.R. und Williams, H.D. (2003) Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 149: 1275 – 1284.
- Cotter, P.A. und Gunsalus, R.P. (1989) Oxygen, nitrate, and molybdenum regulation of *dmsABC* gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171: 3817 - 3823.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176: 2137 - 2142.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. und Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20: 448 – 455.

- Darwin, A.J. und Stewart, V. (1995) Nitrate and nitrite regulation of the Fnr-dependent *aeg-46.5* promoter of *Escherichia coli* K-12 is mediated by competition between homologous response regulators (NarL and NarP) for a common DNA-binding site. *J Mol Biol* 251: 15 - 29.
- Davies, K. J., Lloyd, D. und Boddy, L. (1989) The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 135: 2445 - 2451.
- Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J. und Müller, P. (2003) The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiol* 149: 3395 - 3403.
- Delic-Attree, I. Toussaint, B. und Vignais, P.M. (1995) Cloning and sequence analysis of the genes coding for the integration host factor (IHF) and HU proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 154: 61 - 64.
- Delic-Attree, I. Toussaint, B., Froger, A., Willison, J.C. und Vignais, P.M. (1996) Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in *algD* gene expression. *Microbiol* 142: 2785 - 2793.
- DeMoss, J.A. und Hsu, P.Y. (1991) NarK enhances nitrate uptake and nitrate excretion in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173: 3303 - 3310.
- Deutscher, M.P. (1990) Guide to protein purification. *Methods Enzymol* 182: 50 - 68.
- Dockter, G., Lindemann, H., Tümmler, B., Wunderlich, P. und Dittrich – Weber, H. (1997) Mukoviszidose. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127 – 6146.
- Dunn, N. W., Holloway, B. W. (1971) Pleiotrophy of p-fluorophenylalanine-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet Res* 18: 185 - 197.

- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D. und Schobert, M. (2004 a) Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. J Bacteriol 186: 4596 – 4604.
- Eschbach, M. (2004 b) Molekulare Regulation und Biochemie des anaeroben Langzeitüberlebens von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. Und de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. J Bacteriol 181: 6223 – 6229.
- Farinha, M.A. und Kropinski, A.M. (1990) Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. J Bacteriol 172: 3496 - 3499.
- Frederick, J.R., Elkins, J.G., Bollinger, N., Hassett, D.J. und McDermott, T.R. (2001) Factors affecting catalase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and planktonic cells. Appl Environ Microbiol 67: 1375 – 1379.
- Friedmann, D.I. (1988) Integration host factor: a protein for all reasons. Cell 55: 545 - 554.
- Galimand, M., Gamper, M., Zimmermann, A. und Haas, D. (1991) Positive Fnr-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 173:1598 - 1606.
- Grasemann, H., Ioannidis, I., Tomkiewicz, R.P., de Groot, H., Rubin, B.K und Ratjen, F. (1998) Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. Arch Dis Child 78: 49 - 53.
- Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E.T., Thomson, A.J. und Guest, J.R. (1996) Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in Fnr and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. Biochem J 316: 887 - 892.
- Grunden, A.M., Ray, R.M., Rosentel, J.K., Healy, F.G. und Shanmugam, K.T. (1996) Repression of the *Escherichia coli modABCD* (molybdate transport) operon by ModE. J Bacteriol 178: 735 – 744.
- Görg, A. (1991) Two-dimensional electrophoresis. Nature 349: 545 - 546.



- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, S.R., Hanash, S.M. und Somerlot, L. (1987) Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 8: 122 – 124.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S. und Weser, J. (1995) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 6: 599 - 604.
- Gschaedler, A., Robas, N., Boudrant, J. und Branlant, C. (1999) Effects of pulse addition of carbon sources on continuous cultivation of *Escherichia coli* containing a recombinant *E. coli* gapA gene. *Biotechnol Bioeng* 63 (6): 712 – 720.
- Haas, D., Galimand, M., Gamper, M. und Zimmermann, A. (1990) Arginine network of *Pseudomonas aeruginosa*: specific and global controls. In: *Pseudomonas – biotransformation, pathogenesis and evolving biotechnology*. Silver, S.C., Chakrabarty, A.M., Iglewski, B.H. und Kaplan, S. (eds.), ASM Press, Washington DC, pp. 303 – 316.
- Haas, D., Gamper, M. und Zimmermann, A. (1992) Anaerobic control in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology*. Galli, E., Silver, S. und Withold, B. (eds.), ASM Press Washington, DC, pp. 177 - 187.
- Hager, P.W., Calfee, M.W. und Phibbs, P.V. (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* devB/SOL homolog, *pgl*, is a member of the *hex* regulon and encodes 6-phosphogluconolactonase. *J Bacteriol* 182: 3934 – 3941.
- Hancock, R.E.W. und Nikaido, H. (1978) Outer membranes of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J Bacteriol* 136: 381 – 390.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557 - 580.
- Hanna, S.L., Sherman, N.E., Kinter, M.T. und Goldberg, J.B. (2000) Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiol* 146: 2495 - 2508.

- Harrison, P.M. und Treffry, A. (1999) The role of the dinuclear centers in iron storage in the ferritins. Chapter 15 in: Iron Metabolism: Inorganic Biochemistry and Regulatory Mechanisms. Ferreira, C.C., Moura, J.J.G. und Franco, R. (eds.), Wiley-VCH Verlag.
- Hasegawa, N., Arai, H. und Igarashi, Y. (1998) Activation of a consensus FNR-dependent promotor by DNR of *Pseudomonas aeruginosa* in response to nitrite. FEMS Microbiol Lett 166: 213 – 217.
- Hasona, A., Self, W.T., Ray, R.M. und Shanmugam, K.T. (1998) Molybdate-dependent transkription of *hyc* and *nar* Operons of *Escherichia coli* requires MoeA protein and ModE-molybdate. FEMS Microbiol Lett 169: 111 – 116.
- Hassett, D.J. (1996 a) Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. J Bacteriol 178: 7322 – 7325.
- Hassett, D.J., Sokol, P.A., Howell, M.L., Ma, J.F., Schweizer, H.T., Ochsner, U. und Vasil, M.L. (1996 b) Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth and decreased superoxid dismutase and catalase activities. J Bacteriol 178: 3996 – 4003.
- Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S.V., Rowe, J.J., Yoon, S.S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., Hwang, S.H., McDermott, T.R. und Ochsner, U.A. (2002) Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. Adv Drug Deliv Rev. 54: 1425 – 1443.
- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydon, A., Molin, S., Givskov, M. und Parsek, M.R. (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. J Bacteriol 183: 5395 – 5401.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. und Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. J Bacteriol 172: 6557 - 6567.
- Hiller, K., Schobert, M., Hundertmark, C., Jahn, D., Münch, R. (2003) JVirGel: calculation of virtual two-dimensional protein gels. Nucleic Acids Res 31: 3862 - 3865.

- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J., Schweizer, H. P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212: 77 - 86.
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A. und Schweizer, H.P. (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43: 59 - 72.
- Højberg, O., Schnider, U., Winteler, H.V., Sørensen, J. und Haas, D. (1999) Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil. *Appl Environ Microbiol* 65: 4085 - 4093.
- Hungerer, C., Troup, B., Römling, U. und Jahn, D. (1995) Regulation of *hemA* gene during 5-aminolevulinic acid formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 177: 1435 - 1443.
- Hussain, H., Grove, J., Griffiths, L., Busby, S. und Cole, J. (1994) A seven-gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Mol Microbiol* 12: 153 - 163.
- Jennings, M.P. und Beacham, I.R. (1990) Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II *ansB* and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. *J Bacteriol* 172: 1491 – 1498.
- Jeter, R.M., Sias, S.R. und Ingraham, J.L. (1984) Chromosomal location and function of genes affecting *Pseudomonas aeruginosa* nitrate assimilation. *J Bacteriol* 157: 673 – 677.
- Jüngst, A. und Zumft, W.G. (1992) Interdependence of respiratory NO reduction and nitrite reduction revealed by mutagenesis of *nirQ*, a novel gene in the denitrification gene cluster of *Pseudomonas stutzeri*. *FEBS Lett* 314: 308 – 314.
- Kadir, F.H.A. und Moore, G.R. (1990) Bacterial ferritin contains 24 haem groups. *FEBS Lett* 271: 141 – 143.
- Kaiser, M. und Sawers, G. (1995) Nitrate repression of the *Escherichia coli* *pfl* operon is mediated by the dual sensors NarQ and NarX and the dual regulators NarL and NarP. *J Bacteriol* 177: 3647 - 3655.

- Kalman, L. und Gunsalus, R.P. (1988) The *frdR* gene of *Escherichia coli* globally regulates several operons involved in anaerobic growth in response to nitrate. J Bacteriol 170: 623 - 629.
- Kalman, L. und Gunsalus, R.P. (1989) Identification of a second gene involved in global regulation of fumarate reductase and other nitrate-controlled genes for anaerobic respiration in *Escherichia coli*. J Bacteriol 171: 3810 - 3816.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. und Zinkernagel, R.M. (1998) Medizinische Mikrobiologie. 9. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Kerschen, E.J., Irani, V.R., Hassett, D.J. und Rowe, J.J. (2001) *snr-1* is required for nitrate reduction in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 183: 2125 – 2131.
- Khoroshilova, N., Beinert, H. und Kiley, P. (1995) Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant Fnr protein enhances DNA binding. Proc Natl Acad Sci 92: 2499 - 2503.
- de Kievit, T.R. und Iglewski, B.H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun., 68 (9): 4839 - 4849.
- Koch, B., Jensen, L.E. und Nybroe, O. (2001) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. J Microbiol Meth 45: 187 – 195.
- Krieger, R. (2001) Transkriptionelle Kontrolle der Denitrifikation in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Universität Freiburg.
- Krieger, R., Rompf, A., Schobert, M. und Jahn, D. (2002) The *Pseudomonas aeruginosa* *hemA* promoter is regulated by Anr, Dnr, NarL and Integration Host Factor. Mol Genet Genomics 267: 409 - 417.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680 – 685.

- Lahti, R., Pitkäranta, T., Valve, E., Ilta, I., Kukko-Kalske, E. Und Heinonen, J. (1988) Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 170: 5901 – 5907.
- Laulhere, J.P., Laboure, A.M., Van Wuytswinkel, O., Gagnon, J., Brat, J.F. (1992) Purification, characterization and function of bacterioferritin from the cyanobacterium *Synechocystis* P.C.C.6803. Biochem J 281: 785 - 93.
- Layer, G., Moser, J., Heinz, D.W., Jahn, D. und Schubert, W.D. (2003) Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes. EMBO 22 (23): 6214 - 6224.
- Lazazzera, B.A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M.C. und Kiley, P.J. (1996) DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR proteien from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. J Biol Chem 271: 2762 - 2768.
- Lengeler, J.W., Drews, G. und Schlegel, H.G. (1999) Biology of the Procaryotes. Thieme Verlag S.268.
- Lessie, T.G. und Phibbs, Jr., P.V. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in *Pseudomonads*. Ann Rev Microbiol 38: 359 – 387.
- Lewin, A.C., Doughty, P.A., Flegg, L., Moore, G.R. und Spiro, S. (2002) The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. Microbiol 148: 2449 – 2456.
- Li, J., Mason, S.W. und Greenblatt, J. (1993) Elongation factor NusG interacts with termination factor rho to regulate termination and antitermination of transcription. Genes Dev 7(1): 161 – 172.
- Lohaus, C. und Meyer, H.E. (1998) Proteomforschung. Sonderdruck BIOspektrum, Ausgabe 5.
- de Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. Methods Enzymol 235: 386 - 405.

- Ma, J.-F., Ochsner, U.A., Klotz, M.G., Nanayakkara, V.K., Howell, M.L., Johnson, Z., Posy, J.E., Vasil, M.L., Monaco, J.J., Hassett, D.J. (1999) Bacteroferritin A Modulates Catalase A (KatA) Activity and Resistance to Hydrogen Peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 181: 3730 - 3742.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2003) Brock - Biology of Microorganisms; 10. Edition, Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Massé E, Gottesman S. A. (2002) Small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci 99 (7): 4620 - 4625.
- McNicholas, P.M. und Gunsalus, R.P. (2002) The Molybdate-Responsive *Escherichia coli* ModE transcriptional regulator coordinates periplasmic nitrate reductase (*napFDAGHBC*) operon expression with nitrate and molybdate availability. J Bacteriol 184: 3253 - 3259.
- Mercenier, A., Simon, J. P., Vander Wauven, C., Haas, D. und Stalon, V. (1980) Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 144: 159 - 63.
- Moore, G.R., Kadir, F.H.A., Al-Massad, F.K., Le Brun, N.E., Thomson, A.J., Greenwood, C., Keen, J.N. and Findlay, J.B.C. (1994) Structural heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* bacterioferritin. Biochem J 304: 493 – 497.
- Moreno-Vivian, C., Cabello, P., Martinez-Luque, M., Blasco, R. und Castello, F. (1999) Minireview Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. J Bacteriol 181:6573-6584.
- Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E. und Jahn, D. (2003) PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. Nucleic Acids Res 31: 266 -269.
- Nakada, Y., Nishijyo, T. und Itoh, Y. (2002) Divergent structure and regulatory mechanism of proline catabolic systems: characterization of the *putAP* proline catabolic operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its regulation by PruR, an AraC/XylS family protein. J Bacteriol 184: 5633 – 5640.

- Neilands, J.B. (1990) Ferric uptake regulation (Fur) repressor: facts and fantasies. In: *Pseudomonas – biotransformation, pathogenesis and evolving biotechnology*. Silver, S.C., Chakrabarty, A.M., Iglewski, B.H. und Kaplan, S. (eds.), ASM Press, Washington D.C., pp. 382 – 395.
- Neuhoff, V., Arold, N, Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G250 and R250. *Electrophoresis* 9: 255 - 262.
- Nishijyo, T, Park, S.-M., Lu, C.-D., Itoh, Y., Abdelal, A.T. (1998) Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180: 5559 - 5566.
- Noji, S., Nohno, T., Saito, T. und Taniguchi, S. (1989) The *narK* gene produkt participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. *FEBS Lett* 252: 139 - 143.
- Nunoshiba, T., deRojas-Walker, T., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. und Demple, B. (1993). Activation by nitric oxide of an oxidative stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 90: 9993 - 9997.
- Ochsner, U.A., Vasil, A.I., Vasil, M.L. (1995) Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. *J Bacteriol* 177: 7194 - 7201.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biological Chemistry*, 250: 4007 - 4021.
- Ogawa, K.I., Akagawa, E., Yamane, K., Sun, Z.W., LaCelle, M., Zuber, P. und Nakano, M.M. (1995) The *nasB* Operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177: 1409 – 1413.
- O'Toole, G. A. and Kolter, R.; (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295 - 304.

- Page, L., Griffiths, L. und Cole, J.A. (1990) Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Arch Microbiol* 154 (4): 349 – 354.
- Palleroni, N.J. (2004) Introduction to the family *Pseudomonadaceae*. In: *Prokaryotes – An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Release 3.17, Springer Verlag New York (<http://141.150.157.117:8080/prokPuB/index.htm>).
- Parr, S. R., Barber, D., Greenwood, C. and Brunori, M. (1977). The electrontransfer reaction between azurin and the cytochrome *c* oxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 167: 447 – 455.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. und Iglewski, B.H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260 (5111): 1127 - 1130.
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. und Greenberg, E.P. (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 92 (5): 1490 -1494.
- Pier, G.B., Small, G.J. und Warren H.B. (1990) Protection against mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in rodent models of endobronchial infections. *Science* 249 (4968): 537 - 540.
- Pollack, M. (2000) *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G.L., Benett, J.E. und Dolin, R. (eds.), Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 2310 – 2335.
- Potter, L., Angove, H., Richardson, D. und Cole, J. (2001) Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol*. 45: 51 - 112. Review.
- Rabilloud, T. und Charmont, S. (1999) Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In: *Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods (principles and practise)*. Rabilloud, T. (eds.), Springer Verlag.
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Dorsselaer, A., und Lunardi, J. (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1: 699 - 704.



- Rech, S., Deppenmeier, U. und Gunsalus, R.P. (1995) Regulation of the molybdate transport Operon *modABCD* of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. J Bacteriol 177: 1023 – 1029.
- Rehm, H. (2000) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 3. Auflage, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg - Berlin. Pp. 11-14.
- Richardson, D.J. (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. Microbiol 146: 551 - 571.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., und Chou J.L. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245: 1066 – 1073.
- Rompf, A., Hungerer, C., Hoffmann, T., Lindenmeyer, M.T., Römling, U., Groß, U., Doss, M.O., Arai, H., Igarashi, Y. und Jahn, D. (1998) Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *hemF* and *hemN* by the dual action of the response regulators Anr and Dnr. Mol Microbiol 29: 985 - 997.
- Sabra, W., Kim, E.J. und Zeng, A.P. (2002) Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. Microbiol 148: 3195 - 202.
- Salyers, A.A. und Whitt, D.D. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and related species, a lesson in versatility. In: Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach. 2.Auflage, ASM Press, Washington, DC.
- Sambrook, J., Fritsch, V.X. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol 185: 1140 - 1154.
- Sawers, R.G. (1991) Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 5:1469 - 1481.

- Schlegel, H.G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Schobert, M. (1999) Molekulargenetische Untersuchungen zum Ethanol-oxidierenden System in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Technische Universität Berlin.
- Schobert, M. und Jahn, D. (2002) Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria. J Mol Microbiol Biotechnol 4: 287 – 294.
- Scott, S., Busby, S. und Beacham, I. (1995) Transcriptional co-activation at the *ansB* promoters: involvement of the activating regions of CRP and FNR when bound in tandem. Mol Microbiol 18 (3): 521 – 531.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Bio Technology 1: 784 - 790.
- Simon, J., Sängler, M., Schuster, S.C. und Gross, R. (2003) Elektron transport to periplasmic nitrate reductase (NapA) of *Wolinella succinogenes* is independent of a NapC protein. Mol Microbiol 49(1): 69 - 79.
- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J. und Greenberg, E.P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 407 (6805): 762 - 764.
- Sodergren, E.J., Hsu, P.Y. und DeMoss, J.A. (1988) Roles of the *narJ* and *narI* gene products in the expression of nitrate reductase in *Escherichia coli*. J Biol Chem 263: 16156 - 16162.
- Sonawane, A., Klöppner, U., Derst, C. und Röhm, K.H. (2003) Utilization of acidic amino acids and their amides by *pseudomonads*: role of periplasmic glutaminase-asparaginase. Arch Microbiol 179: 151 – 159.
- SooHoo, C.K. und Hollocher, T.C. (1991) Purification and characterization of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa* strain P2. J Biol Chem 266 (4): 2203 - 2209.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503 - 517.

- Spiro, S. und Guest, G.R. (1990) FNR and its role in oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Rev 75: 399 - 428.
- Spiro, S., Kilic, M.A., Lewin, A., Dobbin-Namiranian, S., Thomson, A., Moore, G.R. (1999) Interactions of heme and other metal ion complexes with the bacterial Fe-uptake regulatory protein and with bacterioferritin. Chapter 14 in: Iron Metabolism: Inorganic Biochemistry and Regulatory Mechanisms. Ferreira, C.C., Moura, J.J.G. und Franco, R. (eds.), Wiley-VCH Verlag.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. und Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. J Bacteriol 169: 5789 - 5794.
- Steinberg, T.H., Chernokalskaya, E., Berggren, K., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P. und Patton, W.F (2000) Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium chelate stain. Electrophoresis 21: 486 - 496.
- Stewart, V. (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 9: 425 - 434.
- Stewart, V., Lu, Y. und Darwin, A.J. (2002) Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 184:1314 - 1323.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol 56: 187 - 209.
- Totten, P.A., Lara, J.C. und Lory, S. (1990) The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. J Bacteriol 172: 389 – 396.
- Trunk, K., Quäck, N., Münch, R., Eschbach, M., Jänsch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., Jahn, D. und Schobert, M. Two redox regulators – one DNA binding site: definition of the *Pseudomonas aeruginosa* Anr and Dnr regulons. (submitted, Mol Microbiol).

- Tyson, K.L., Bell, A.I., Cole, J.A. und Busby, S.J.W. (1993) Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli nirB* promoter: interactions between FNR and NarL. *Mol Microbiol* 7:151 - 157.
- Vander Wauven, C, Pierard, A., Kley-Raymann, M. und Haas, D. (1984) *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* 160: 928 - 934.
- Vasil, M.L., Ochsner, U.A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* 34 (3): 399 - 413.
- Verhoogt, H.J.C., Smit, H., Abee, T., Gamper, M., Driessen, A.J.M., Haas, D. und Konings, W.N. (1992) *ArcD*, the first gene of the arc operon for anaerobic arginine metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, encodes an arginine-ornithine exchanger. *J Bacteriol* 174: 1568 – 1573.
- Vijgenboom, E., Busch, J.E., Canters, G.W. (1997) In vivo studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that *azu* expression is under control of rpoS and ANR. *Microbiol* 143: 2853 - 63.
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. und Iglewski, B.H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185: 2080 - 2095.
- Wang, H., Tseng, C.P. und Gunsalus, R.P. (1999) The *napF* and *narG* nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. *J Bacteriol* 181: 5303 – 5308.
- Watnick, P. and Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*: 182: 2675 – 2679.
- Whiteley, M., Lee, K.M. und Greenberg, E.P. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 96 (24): 13904 - 13909.
- Wilderman, P.J., Sowa, N.A., FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A., Vasil, M.L. (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* 101 (26): 9792 – 9797.

- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. und Williams, K.L. (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 19 - 50. Review.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Sanchez, J.C., Bairoch, A. und Hochstrasser, D.F. (1998) Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: The effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 19: 1501 – 1505.
- Winteler, H.V. und Haas, D. (1996) The homologous regulators Anr of *Pseudomonas aeruginosa* and Fnr of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. *Microbiology* 142: 685 - 693.
- Winteler, H.V., Schneidinger, B., Jaeger, K.E., Haas, D. (1996) Anaerobically controlled expression system derived from the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*: application to lipase production. *Appl Environ Microbiol* 62: 3391 - 3398.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J.R., Randell, S., Boucher, R.C. und Döring, G. (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109: 317 - 25.
- Wozniak, D.J. (1994) Integration host factor and sequences downstream of the *Pseudomonas aeruginosa algD* transcription start site are required for expression. *J Bacteriol* 176: 5068 - 5076.
- Wozniak, D.J. und Ohman, D.E. (1993) Involvement of the alginate *algT* gene and integration host factor in the regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algB* gene. *J Bacteriol* 175: 4145 - 4153.
- Ye, R. W., Haas, D., Ka, J. O., Krishnapillai, V., Zimmermann, A., Baird, C. Tiedje, J. M. (1995) Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol* 177: 3606 - 3609.
- Yamano, Y., Nishikawa, T. und Komatsu, Y. (1998) Involvement of the RpoN protein in the transcription of the *oprE* gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 162 (1): 31 – 37.

- Yohannes, E., Barnhart, D.M. und Slonczewski, J.L. (2004) pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 186: 192 – 199.
- Yoneyama, H., Yamano, Y und Nakae, T. (1995) Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. Biochem Biophys Res Commun 213: 88 – 95.
- Yoneyama, H. und Nakae, T. (1996) Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. Microbiol 142 (8): 2137 – 2144.
- Zagorec, M., Buhler, J.M., Treich, I., Keng, T., Guarente, L. und Labbe-Bois, R. (1988) Isolation, sequence and regulation by oxygen of yeast *HEM13* gene coding for coproporphyrinogen oxidase. J Biol Chem 263: 9718 – 9724.
- Zimmermann, A., Reimann, C., Galimand, M. und Haas, D. (1991) Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 5: 1483 - 1490.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol Mol Biol Rev 61: 533 - 616.

## 5.2 Internet - Adressen

### BLAST-Server:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine,  
National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

### Expasy:

<http://www.expasy.org>

(Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Swiss)

### JVirGel:

<http://www.jvirgel.de>

(Technische Universität Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. D. Jahn)

Mascot-Datenbank:

<http://matrix-science.com>

(Matrix Science Inc., Boston, Massachusetts, USA)

PRODORIC-Datenbank:

<http://www.prodoric.de>

(Technische Universität Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. D. Jahn)

*Pseudomonas*-Genomprojekt:

<http://www.pseudomonas.com>

(*Pseudomonas Genome Project*, University of British Columbia, Vancouver, B.C., Canada)

TIGR-Datenbank:

<http://tigr.org>

(The Institute for Genomic Research, Rockville, Maryland, USA)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen und dessen steter Hilfsbereitschaft und hervorragender Betreuung ich mir jeder Zeit gewiss sein konnte. Für die Gelegenheit des Forschungsaufenthaltes in Dänemark und der Teilnahme an zahlreichen Tagungen möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. K. Timmis, sowie Herrn Prof. Dr. R. Mendel für die freundliche Teilnahme an der Prüfungskommission.

Ohne die Unterstützung meines Arbeitsgruppenleiters Max Schobert wäre mir die Durchführung dieser Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund möchte ich mich bei ihm für seine konstruktiven Gespräche, seinen zahlreichen Anregungen und vor allem seiner Hilfsbereitschaft bedanken.

Der „*Pseudomonas*-Gruppe“ danke ich herzlichst für die gute Zusammenarbeit, zahlreichen Diskussionen und Vermittlung vieler molekularbiologischer Techniken. Mein besonderer Dank für die schöne Zeit gilt Katharina Trunk, Martin Eschbach, Beatrice Benkert, Kerstin Schreiber, Dana Heldt, Nelli Bös, Jens Fröde und Dr. Elisabeth Härtig.

Für die große Hilfe bei allen Computer-spezifischen Problemen danke ich der bioinformatischen Abteilung unseres Arbeitskreises. Speziell bei Karsten Hiller möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei der Auswertung meiner Daten mit dem Programm JVirGel bedanken.

Erkenntlich zeigen möchte ich mich auch bei Dr. Lothar Jänsch und Mitarbeitern für die MS-Identifizierung von vielen Proteinen.

Bei allen bisher nicht genannten Mitgliedern des gesamten Arbeitskreises Jahn bedanke ich mich für die angenehme und kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Für die persönliche Unterstützung während dieser Zeit möchte ich mich bei meinem Partner Henning Mainz liebevoll bedanken.



## Lebenslauf

Name: Nicole Quäck

Geburtsdatum: 08.05.1976

Geburtsort: Rodewisch / Vogtland

1992 - 1990: Polytechnische Oberschule in Tannenbergsthal.

1990 - 1992: Erweiterte Oberschule in Klingenthal, Mittelschulabschluss.

1992 - 1994: Gymnasium Klingenthal in Klingenthal, Abitur.

1994 - 2001: Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig .

Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur limnischen und marinen Anreicherung des Eisenbakteriums *Gallionella ferruginea* vor dem Hintergrund „Volcanic hot springs as clues to the precipitation of precambrian iron formation, origin of life and terraforming Mars“.

2001 - 2005: Arbeit an der Dissertation am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität in Braunschweig.

Thema: Proteomanalyse des anaeroben regulatorischen Netzwerkes von *Pseudomonas aeruginosa*.